



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Camille-Charlotte BALANÇA

Le 18 février 2021

**Contribution des réponses immunitaires adaptatives spécifiques
des antigènes tumoraux à l'efficacité clinique de
l'immunothérapie par inhibition de l'axe PD-1/PD-L1**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Maha AYYOUB

Jury

Mme Nathalie BONNEFOY, Rapporteuse

M. Daniel SPEISER, Rapporteur

Mme Fathia MAMI-CHOUAIB, Examinatrice

M. Bruno SEGUI, Examineur

M. Eric TARTOUR, Examineur

Mme Maha AYYOUB, Directrice de thèse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Camille-Charlotte BALANÇA
Le 18 février 2021

Contribution des réponses immunitaires adaptatives spécifiques des antigènes tumoraux à l'efficacité clinique de l'immunothérapie par inhibition de l'axe PD-1/PD-L1

École doctorale :
BSB – Biologie, Santé, Biotechnologies
Spécialité : Cancérologie
Unité de recherche :
CRCT – Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Maha AYYOUB

Jury :
Mme Nathalie Bonnefoy, Rapporteuse
Mr. Daniel Speiser, Rapporteur
Mme Fathia Mami-Chouaib, Examinatrice
Mr. Eric Tartour, Examineur
Mr. Bruno Ségui, Examineur
Mme Maha Ayyoub, Directrice de thèse

« Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est la beauté et la noblesse de la science : un désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles. »

Marie Curie

*« N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès.
Essayez de devenir un homme qui a de la valeur. »*

Albert Einstein

« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie

"Nous ne pouvons choisir les circonstances extérieures, mais nous pouvons toujours choisir la façon dont nous répondons à celles-ci."

Épictète

*"Être heureux ne signifie pas que tout est parfait.
Cela signifie que vous avez décidé de regarder au-delà des imperfections."*

Aristote

*"Vis comme si tu devais mourir demain.
Apprends comme si tu devais vivre toujours."*

Gandhi

REMERCIEMENTS

*Je souhaiterais en premier lieu remercier les membres du jury qui ont bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail de thèse. Un grand merci au Pr. **Bruno Ségui**, qui a été mon maître de stage de master 2, d'avoir présidé ce jury, ce fut un réel plaisir. Je remercie particulièrement le Dr. **Nathalie Bonnefoy** et le Pr. **Daniel Speiser** qui ont accepté la tâche de rapporteur, ils ont examiné et corrigé avec attention mon manuscrit. Je remercie également le Dr. **Fathia Mami-Chouaib** et le Pr. **Éric Tartour** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineurs.*

*C'est avec une grande émotion que je remercie ma directrice de thèse, le Pr. **Maha Ayyoub**, pour avoir cru en mes capacités d'étudiante, pour l'accueil dans son équipe et pour les projets passionnants qu'elle m'a confiés. Maha, j'aimerais te remercier pour m'avoir enseigné la rigueur, le savoir et le savoir-faire scientifiques. J'admire ton regard critique, ta capacité d'analyse et ta détermination. Quel bonheur de voir que nos discussions scientifiques ont permis l'élaboration de nouvelles expériences, l'avancement et l'aboutissement de nos travaux. Tu m'as transmis le sens du détail et la passion de notre métier. Je suis fière d'avoir publié mes premiers articles avec toi, ce fut de magnifiques projets. Je te remercie pour m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès, nationaux et internationaux, ce fut très enrichissant. Tu as su me soutenir au quotidien sur le plan professionnel mais également personnel. C'était un réel plaisir de travailler avec une spécialiste en immunologie aussi talentueuse que toi. Tu as été et tu demeureras un exemple à suivre. J'espère que la vie nous réunira à nouveau afin de travailler ensemble sur de nouveaux projets.*

Je remercie toute l'équipe dans laquelle la bienveillance, l'entraide et la joie règnent.

***Virginie**, je te remercie d'avoir toujours été là pour m'écouter, me motiver et me rassurer durant mes (fréquents, voire très fréquents) moments de stress. Tu m'as aidé à avoir confiance en moi et à toujours aller de l'avant en me focalisant sur le positif. J'espère que tu te rends compte que ton soutien, dans l'avancement de ma thèse, dans mes futurs projets mais également dans ma vie personnelle, m'a été d'une immense aide. Un grand merci pour tes conseils, dans tous les domaines et sans filtre. Merci pour cette complicité, ces nombreux rires et ces moments de partage. Je suis désolée de t'annoncer que tu as dépassé le seuil « collègue de travail », je continuerai donc à t'appeler pour te raconter mes aventures de la vie (avec toujours autant de détails, on est d'accord) et pour écouter les tiennes, avec grand plaisir.*

Clara, mille mercis pour avoir cru en moi dès la première fois que nous nous sommes rencontrées. Tu m'as transmis le savoir-faire scientifique, tu m'as formée dans les expériences clefs de l'immunologie anti-tumorale. Je te remercie d'avoir largement contribué à mes articles de thèse, ce fut un plaisir de travailler avec toi. J'étais également très heureuse de participer aux congrès avec toi, quel duo de choc ! Tu as toujours été là pour m'écouter, me conseiller et me soutenir. Tu m'as même supportée pendant mes épisodes maniaques, mais je sais que tu m'aimes quand même. Je te remercie pour ces moments de partage en dehors du labo, tu as été plus qu'une collègue. Ton accent Sicilien est celui que je préfère parmi tous les accents dans le monde entier, ne le perds jamais.

Carlos M.G., mon co-thésard adoré. Je te remercie de m'avoir soutenue et aidée pendant ces trois années de thèse. Je te remercie pour ton aide concernant la récolte des échantillons et l'accessibilité aux données cliniques des patientes. Merci pour les moments de détente, de rire et de lâcher-prise que tu nous as accordé. Merci pour ton humour, ta générosité, ta gentillesse et pour toutes ses petites erreurs de français qui sont trop mignonnes. Tu m'as aidé à gérer mon stress, à me recentrer sur ce qui est important. Je ne garderai que des bons souvenirs de nos PhD que nous avons réalisés en même temps. J'espère que l'on pourra partager encore et encore des moments de bonheur.

Marie, un grand merci pour ton aide précieuse dans l'avancement de ma thèse. Merci pour ton efficacité dans la réalisation d'expériences pour les articles que nous avons écrits ensemble. C'était un réel plaisir de partager le bureau avec toi, on a travaillé sérieusement mais aussi (beaucoup) ri. Tu t'es rendue toujours disponible et prête à apporter ton aide, c'était un bonheur de travailler avec toi, tu es une coéquipière de thèse parfaite.

Christel, merci pour ton soutien et tes conseils qui m'ont permis de prendre confiance en moi, de valoriser mon travail et de m'expérimenter en communication orale. Je te remercie de m'avoir partagé tes expériences scientifiques et humaines. La réalisation artisanale de brassards, prise en flagrant délit dans le bureau, reste mon meilleur souvenir avec toi.

Françoise, un grand merci pour ta gentillesse et ta sincérité. Tu as eu le rôle de maman de l'équipe, tu sais réconforter, rassurer, motiver. Je te remercie d'avoir été à mes côtés pendant les moments difficiles. Tu es une personne exceptionnelle que tout le monde rêve d'avoir à ses côtés.

Victor, merci pour ton aide dans mes premières expériences de thèse et pour le lien que tu as maintenu entre le labo et l'hôpital, essentiel pour mes projets. Je te remercie de m'avoir fait passer des journées agréables et de m'avoir toujours fait rire. Malgré nos gentilles accroches, j'ai adoré t'avoir comme collègue, comme on dit ; qui aime bien, châtie bien.

***Anna**, je te remercie pour ton aide dans la réalisation des révisions de mon second article. Même si nous nous sommes croisés qu'une année c'était un bonheur de travailler avec toi. Je te remercie pour ta gentillesse et ton soutien.*

***Lucile**, merci pour l'attention que tu m'as témoignée. Merci pour tes punchlines que tu lances parfois et qui nous ont tous fait bien rire. Merci pour tes messages de soutien qui m'ont fait chaud au cœur.*

***Carlos G.R. et Jonathan**, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté concernant mes projets. Merci pour votre considération, gentillesse et disponibilité. Un grand merci d'avoir permis le lien entre les données cliniques et expérimentales du labo. Une pensée particulière à Carlos pour ses blagues décalées (mais très drôles), qu'on aime tous.*

***Alex**, merci pour ton aide dans la collecte des échantillons de patientes, grâce auxquels j'ai pu accéder à du matériel précieux et valider mes résultats dans des grandes cohortes. Merci pour toutes les friandises que tu venais déposer dans mon bureau, elles m'ont permis une meilleure concentration.*

Merci aux bébés 2020 de l'équipe qui nous ont tous réjouis : Nour, Chloé, Paul, Luis, Liam et Arthur.

***Céline et Bruno**, un grand merci pour votre accueil durant mon stage de master 2. Vous avez su me guider dans mon entrée dans le domaine de la recherche. Je vous remercie pour vos conseils, votre soutien et pour avoir vérifié que tous se passait au mieux pendant ma thèse. Merci de m'avoir fait rencontrer Maha.*

***Valérie et Denis**, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Vous avez suivi mes projets avec attention et vous avez permis leur valorisation. Merci pour les échanges scientifiques passionnants que nous avons eu. Valérie, je te remercie d'avoir établi le premier lien avec Maha. Merci également pour ta lettre de recommandation qui m'a été très utile pour mes candidatures de postdoc.*

Merci aux médecins de l'IUCT-O d'avoir contribué à la collecte des échantillons de patients. Merci à Camille F. et Philippe R. pour votre aide précieuse pour les IHC. Merci au service d'anatomopathologie pour votre accueil et votre gentillesse.

Merci aux ingénieurs et chercheurs du plateau technique du CRCT pour la réalisation et l'analyse d'expériences qui ont été nécessaires à la publication des articles.

Je remercie également les personnes du CRCT que j'ai croisées durant ma thèse, celles avec qui j'ai seulement échangé des sourires et d'autres de longues conversations enrichissantes. Je remercie particulièrement les habitants du 4^{ème} étage avec qui j'ai échangé des discussions et des rires, c'était toujours très agréable. Merci aux filles de l'équipe I3 pour leur bonne humeur et leur soutien.

Je remercie également les laboratoires Roche et plus particulièrement le réseau ImCore pour m'avoir financé mes trois années de thèse.

À ma famille

Maman, Papa, j'aimerais vous remercier de tout cœur pour m'avoir toujours incitée à faire ce qui ce me plaisait. Merci de m'avoir offert la possibilité de suivre de longues études dans le domaine qui me passionne. Vous m'avez donné accès à une voie professionnelle très enrichissante, j'espère que je saurai suivre le chemin de la réussite et de l'épanouissement. Merci de m'avoir enseigné les valeurs de la vie dont je suis fière. Vous m'avez toujours soutenue et aidée dans tout ce que j'ai entrepris. C'est grâce à vous si j'ai pu m'épanouir dans mes études et dans ma vie. J'ai une chance inestimable de vous avoir, vous êtes des parents formidables, prêts à tout pour vos enfants. Je suis toujours très heureuse de partager des moments en famille avec vous, ensemble. Merci de croire en moi, de me montrer que vous êtes fiers de moi et d'être toujours là. Merci pour votre amour inconditionnel. Je vous aime.

Mon frère chéri, je te remercie pour ton soutien, ta gentillesse et ta bienveillance. Merci pour avoir toujours vérifié que ma thèse avançait comme je voulais et que tout allait bien pour moi. Merci pour la complicité et le partage qui règnent entre nous. Le lien entre frère et sœur est pour moi le plus fort, je suis fière de le partager avec toi, il existera et se renforcera toute notre vie. Quoiqu'il arrive, nous serons toujours là l'un pour l'autre. Merci pour ta confiance et ton amour. Je t'aime.

Je remercie mes tantes, oncles, grands-parents, cousins et cousines pour avoir toujours cru en moi. Merci de votre soutien et de l'intérêt que vous avez porté à mes études. Merci pour les moments de bonheur que nous partageons dès que nous en avons l'occasion et qui me font toujours chaud au cœur. Notre famille est riche d'une diversité de personnalités, de caractères, de modes de vie, et d'états d'esprit, c'est un trésor qui nous lie et nous complète pour faire face ensemble aux combats de la vie mais surtout pour partager des moments de joie.

À mes amis

On dit souvent que les amis sont la famille que nous choisissons.

Et bien de mon côté, je les ai divinement bien choisis.

***Cécile**, je te remercierai jamais assez pour le soutien que tu m'apportes au quotidien. Tu as été et tu resteras essentielle à mon avancée professionnelle et personnelle. J'aime ce qui nous lie, ce que nous partageons et ce que nous dégageons. Merci pour ces moments de rire, folie, voyage, retrouvailles et même ces moments de galère, les meilleurs. Merci de te soucier de mon bonheur. Merci de toujours me rappeler comme la vie est belle.*

***Anne-Charlotte**, je te remercie d'être toujours présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour ta curiosité et ton intérêt pour ma thèse. Merci pour ces moments de partage qui me font toujours un bien fou. Merci d'être si bienveillante et attentionnée. Merci de partager ma vie.*

***Morgane**, je te remercie pour ton soutien inconditionnel. Merci pour tous tes conseils, dans tous les domaines. Merci de toutes tes petites attentions qui me font tellement plaisir. Merci de trouver une solution à tout. Tu sais motiver, rassurer, donner confiance en soi.*

***Les filles**, vous êtes incroyables, j'ai tellement de chance de vous avoir. Je suis fier de ce que l'on est à nous quatre. Vous comptez énormément à mes yeux. Je vous aime.*

***Martin**, merci pour les rires incessants que nous partageons à chaque fois que nous en avons l'occasion. Merci d'être là pour moi en toute circonstance. Merci pour cette coloc du bonheur.*

***Rémi**, je te remercie d'être là pour moi et pour ma famille. Merci pour ton attention et ton soutien dans l'avancée de ma thèse. C'est un réel bonheur de partager des moments avec toi.*

***Amélia**, je te remercie pour ton soutien tout au long de mes études. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Merci pour tes conseils qui m'ont beaucoup aidée.*

*Je remercie de tout cœur : **Jordane, Antho P., Vivie, Antho L., Caro, Ornella, Paul R., Alix, Louis, Swann, Pauline, Clément**. Merci pour votre soutien et pour nos moments de partage.*

*Merci à **Jeanne** et **Léonie**, deux trésors de la vie qui me donnent toujours le sourire.*

*Merci à **Viviane** et **Monique** des mamans exceptionnelles qui ont toujours su me témoigner leur enthousiasme et leur fierté quant à mon parcours.*

***Stéphane**, merci pour ton accueil et ton soutien. Merci d'avoir participé à mon insertion professionnelle. Merci de m'avoir transmis le sens du travail sérieux, droit et respecté.*

***Sophie L.**, vous m'avez aidé à comprendre les choses qui nourrissent mon malheur, mon angoisse et mon appréhension pour enfin les reconnaître, les accepter et les surmonter, merci.*

*À mon grand-père,
À ma tante*

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	16
LISTE DES FIGURES	20
LISTE DES TABLEAUX.....	23
RÉSUMÉ.....	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	26
I) L'immunité anti-tumorale.....	26
1. Tumorigénèse	26
1.1 Hallmarks du cancer	26
1.2 Microenvironnement tumoral	27
2. Les tumeurs solides.....	28
2.1 Cancer des VADS	28
2.2 Cancer de l'ovaire.....	30
2.3 Cancer du col de l'utérus.....	33
3. Immunosurveillance du cancer	36
3.1 Historique : Mise en évidence de l'immunité anti-tumorale	36
3.2 Généralités sur la réponse immunitaire dans le cancer	37
3.3 Cycle de l'immunité spécifique anti-cancer	39
4. Antigènes tumoraux.....	40
4.1 Antigènes surexprimés.....	42
4.2 Antigènes de différenciation	42
4.3 Antigènes « cancer/lignée germinale »	43
4.4 Antigènes mutés.....	44
4.5 Antigènes viraux.....	46
5. Réponse lymphocytaire T spécifique de la tumeur	46
5.1 Cellules dendritiques.....	46
5.2 Activation des lymphocytes T	47
5.3 Sous-populations de lymphocytes T CD4.....	51
5.4 Mécanisme d'action des CTL.....	55
5.5 Aide des lymphocytes T CD4 aux CTL.....	57
5.6 T $\gamma\delta$	60
5.7 Mémoire (T _{CM} , T _{EM} , T _{RM})	61
II) La tumeur échappe au système immunitaire	66
1. Immunoediting.....	66
1.1 Élimination	67
1.2 Équilibre	68
1.3 Échappement	68
2. Phénotypes immunitaires du cancer	69
2.1 Tumeurs chaudes et froides.....	69
2.2 Éléments qui influencent le profil immunitaire	70
3. Microenvironnement tumoral immunosuppresseur.....	72
3.1 Recrutement et induction de cellules immunes immunosuppressives.....	73
3.2 Molécules immunosuppressives.....	77
4. Blocage du cycle de l'immunité du cancer	86

SOMMAIRE

4.1	Perte d'immunogénicité ou de reconnaissance des cellules tumorales.....	86
4.2	Défaut de maturation des DC.....	87
4.3	Perte d'attraction des LT au site tumoral	87
4.4	Défaut d'entrée des LT dans la tumeur.....	88
4.5	Rencontre LT/cellules tumorales altérée	89
5.	Points de contrôle de l'immunité	90
5.1	CTLA-4.....	91
5.2	PD-1	92
5.3	TIGIT	94
5.4	TIM-3	96
5.5	LAG-3	97
5.6	CD39	98
6.	Épuisement des lymphocytes T	101
6.1	Identification	101
6.2	Induction	101
6.3	Caractéristiques.....	102
6.4	Lignée de différenciation indépendante	103
6.5	Différents degrés d'épuisement.....	104
6.6	LT CD4 épuisés.....	105
6.7	Techniques d'analyse	105
6.8	Réversion.....	106
III)	L'immunothérapie	107
1.	Anticorps monoclonaux, modulateurs du système immunitaire et virus oncolytiques.....	108
1.1	Anticorps monoclonaux	108
1.2	Modulateurs du système immunitaire.....	110
1.3	Virus oncolytiques	111
2.	Vaccins anti-cancer	112
2.1	Formulés avec des cellules tumorales	113
2.2	Formulés avec des antigènes tumoraux	114
3.	Transfert adoptif de lymphocytes T.....	116
3.1	TIL	116
3.2	TCR transgénique	118
3.3	CAR T cell	118
4.	Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire	121
4.1	Développement clinique et mécanismes d'action des anticorps bloquant CTLA-4 et PD-1	121
4.2	Inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique	126
4.3	Efficacité clinique de l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 dans les cancers de l'ovaire, du col de l'utérus et des VADS.....	128
5	Combinaisons impliquant les inhibiteurs de PCI.....	130
5.1	Plusieurs anticorps ciblant les PCI.....	131
5.2	Combinaison avec les traitements standards	132
5.3	Combinaison avec d'autres immunothérapies	134
	OBJECTIFS	135
	RÉSULTATS	136
I)	Article 1: Dual relief of T-lymphocyte proliferation and effector function underlies response to PD-1 blockade in epithelial malignancies	138
	Contexte.....	138
	Article	139
	Conclusion.....	165

II) Article 2: PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating exhausted PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 T cells	166
Contexte	166
Article	167
Conclusion	195
III) Analyse phénotypique des LT$\gamma\delta$ infiltrant la tumeur des patients	196
Contexte	196
Résumé	197
Résultats	198
Article	201
Conclusion	253
CONCLUSION	254
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	256
1. Modèles d'étude	256
2. L'épuisement, une lignée de différenciation distincte	257
3. Acquisition progressive de l'épuisement	258
4. Facteurs intracellulaires responsables de l'épuisement	260
5. Spécificité tumorale	261
6. Résidence tumorale	264
7. Activité anti-tumorale persistante des TIL épuisés	265
8. Rôle des LT CD4 dans la tumeur	266
9. Rôle du CD39 dans les TIL épuisés	268
10. Mécanismes d'action des anticorps anti-PD-1	269
11. Population cible des anticorps anti-PD-1	270
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	274

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

AA : Acides aminés
Ac : Anticorps
AcM : Anticorps monoclonaux
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADO : Adénosine
Ag : Antigène
AHR : Aryl hydrocarbon receptors
AP-1 : Activation protein-1
ARG : Arginase
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine Triphosphate

B

BATF : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor
Bcl-2/6/xL : B-cell lymphoma 2/6/-extra large
Blimp1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1
BRAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma homolog B1
BV8 : prokineticin-2

C

CAR : Chimeric antigen receptor
CCL5/21 : Chemokine C-C motif Ligand 5/21
CCR5/7 : Chemokine C-C motif Receptor 5/7
CD4 CTL : Lymphocyte T CD4 cytotoxique
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
CEA : Carcino-embryonnaire
CHIP : Chimiothérapie intrapéritonéale
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
COX : Cyclooxygenase
CPA : Cellules présentatrices d'antigène
CRTAM : Class I-restricted T cell-associated molecule
CTA : Cancer-Testis Antigens
CTL : Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen 4
CXCL9/10 : Chemokine CXC motif Ligand 9/10
CXCR3/6 : Chemokine CXC motif Receptor 3/6

D

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DC : Dendritic Cell

LISTE DES ABRÉVIATIONS

E

EGFR : Epidermal growth factor receptor
EOMES : Eomesodermin
ERAD : ER-Associated Degradation system
ERK : Extracellular signal-regulated kinases

F

Fas-L : Fas-Ligand
FDA : Food and Drug Administration
FOXP3 : Forkhead box P3

G

GATA3 : GATA binding protein 3
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

H

HBV : Virus de l'hépatite B
HDAC : Histone déacetylase
HEV : Veinules à endothélium épais
HIF : Hypoxia-Inductible Factor
HLA : Human Leukocyte Antigen
HMGB1 : High-mobility group box 1 protein
HPV : Virus du papillome humain

I

ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule
ICOS : Inducible T-cell COStimulator
IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN- γ : Interferon- γ
Ig : Immunoglobulines
IL-2 : Interleukine-2
ILC : Innate Lymphoid Cell
iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase
IPRES : Innate PD-1 Resistance
irAE : Immune-related Adverse Events
IRF1 : Interferon Regulatory Factor 1
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM : Immunoreceptor tyrosine- based switch motif
ITT : Immunoglobulin Tail-Tyrosine

K

KIR : Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor
KLF2 : Krüppel-like Factor 2
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LISTE DES ABRÉVIATIONS

L

LAG-3 : Lymphocyte activation gene-3
LB : Lymphocytes B
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LFA1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
LN : Lymph Node
LT : Lymphocyte T

M

MAGE : Melanoma Antigen
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MART-1 : Melanoma-Associated Antigen Recognized by T cells
MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells
MEK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
moDC : Monocyte-derived Dendritic Cells
néoAg : néo-antigène

N

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
NFAT : Nuclear factor of activated T cells
NK : Natural Killer
NO : Nitric Oxide
NOS : Oxyde nitrique synthase
NY-ESO-1 : New York Esophageal Squamous cell carcinoma-1

O

OLS : Organe lymphoïde secondaire

P

PAMP : Pathogene Associated Molecular Pattern
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PCI : Points de contrôle immunitaire
PD-1 : Programmed cell death protein 1
PD-L1 : Programmed cell Death-Ligand 1
PGE₂/H₂ : Prostaglandine E₂/H₂
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PP2A : Protein phosphatase 2
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

R

RAG 2 : Recombination Activating Gene 2
RE : Réticulum Endoplasmique
RI : Récepteur inhibiteur
ROS : Reactive Oxygen Species

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Runx3 : RUNX Family Transcription Factor 3

S

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

S1PR1 : Récepteur de la Sphingosine-1-Phosphate

scFv : chaines uniques de régions variables

scRNAseq : séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique

SHP-1/2 : Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1/2

SI : Système immunitaire

SMAC : Central SupraMolecular Activation Complex

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T

T-bet : T-box transcription factor

T-VEC : Talimogene laherparepvec

TAM : Macrophages associés aux tumeurs

TAP : Transporter associated with Antigen Processing

TCF1 : T cell factor 1

T_{CM} : LT mémoires centraux

TCR : Récepteur des LT

T_{EM} : LT mémoires effecteurs

T_{EMRA} : Terminally differentiated effector memory T cells

TGF- β : Transforming Growth Factor β

Th : LT auxiliaire

TIGIT : T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains

TIL : LT infiltrant la tumeur

TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin domain 3

TLR : Toll-Like Receptor

TLS : Tertiary lymphoid structure

TME : Microenvironnement tumoral

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

TOX : Thymocyte selection-associated high mobility group box protein TOX

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing Ligand

Treg : LT régulateurs

T_{RM} : LT résidants mémoires

TRP-1/2 : Tyrosinase-Related Protein-1/2

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

W

WT1 : Wilms tumor 1

Z

ZAP-70 : Zeta-chain-associated protein of 70 kDa

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Sites anatomiques des cancers des VADS (Chow, NEJM, 2020).
- Figure 2** : Représentation de l'appareil reproducteur féminin (INCa).
- Figure 3** : Cycle de l'immunité du cancer (Chen et Mellman, Immunity, 2013).
- Figure 4** : Classes d'Ag tumoraux reconnus par les LT (Coulie *et al.*, Nature review, 2014).
- Figure 5** : Fréquence des mutations somatiques dans les cancers (Lawrence *et al.*, Nature, 2013).
- Figure 6** : Présentation croisée (Mintern *et al.*, Current opinion in Immunology, 2015).
- Figure 7** : Les trois signaux d'activation des LT (Halloran, NELM, 2004).
- Figure 8** : Synapse immunologique (Friedl *et al.*, Nature review, 2005).
- Figure 9** : Contribution des LT CD4 à l'immunité anti-tumorale (Kim et Cantor, Cancer Immunology Research, 2014).
- Figure 10** : Entrée des lymphocytes par les HEV (Girard *et al.*, Nature review, 2012).
- Figure 11** : Amorçage des CTL (Borst *et al.* Nature review, 2018).
- Figure 12** : Interactions moléculaires durant la deuxième étape d'amorçage (Borst *et al.* Nature review, 2018).
- Figure 13** : Hétérogénéité phénotypique des lymphocytes T mémoires (Sallusto *et al.* Annual review of immunology, 2004).
- Figure 14** : Signature des T_{RM} (Mami-Chouaib *et al.*, Journal for Immunotherapy of Cancer, 2018).
- Figure 15** : Le concept d'immunoediting du cancer (Schreiber *et al.* Science 2011).
- Figure 16** : Phénotypes immunitaires du cancer (Chen et Mellman, Nature review, 2017).
- Figure 17** : Mécanismes d'échappement au système immunitaire (Vesely *et al.*, Annual review of immunology, 2011).
- Figure 18** : Mécanismes d'immunosuppression des Treg (Vignali *et al.*, Nature review of immunology, 2008).
- Figure 19** : L'évasion immune médiée par la signalisation du TGF- β dans les tumeurs à un stade avancé (Batlle et Massagué, Immunity review, 2019).
- Figure 20** : La déplétion en L-Arg par l'ARG inhibe la réponse immunitaire. (Grzywa *et al.*, Frontiers in Immunology, 2020).

Figure 21 : La voie de l'Ado dans le microenvironnement de la tumeur. (Antonioli *et al.*, Nature Review Cancer, 2013).

Figure 22 : La PGE2 participe à l'immunosuppression des tumeurs (Wang et Dubois, Nature Review Cancer, 2010).

Figure 23 : Facteurs qui influencent le cycle de l'immunité du cancer (Chen et Mellman, Nature review, 2017).

Figure 24 : Voies de signalisation des PCI dans les LT (Wherry et Kurachi, Nature Reviews Immunology, 2015).

Figure 25 : CTLA-4 et PD-1 dans l'évolution de la réponse immune (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012).

Figure 26 : L'axe TIGIT / CD226 / CD96 / CD112R. (Chauvin et Zarour, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020).

Figure 27 : CD39 dans le cycle de l'immunité du cancer (Allard *et al.*, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020).

Figure 28 : Modèle d'activation des LT après reconnaissance de l'Ag (McLane *et al.*, Annual Review of Immunology, 2019).

Figure 29 : Composés d'un vaccin anti-cancer efficace (Hu *et al.*, Nature Review Immunology, 2018).

Figure 30 : Trois moyens de modifier génétiquement des LT afin de leur conférer une spécificité pour les Ag tumoraux (Restifo *et al.*, Nature Review Immunology, 2012)

Figure 31 : Structure des CAR (Zhao et Cao, Frontiers in Immunology, 2019)

Figure 32 : Chronologie du développement clinique des inhibiteurs de PCI, depuis la première administration chez l'Homme jusqu'à l'approbation par la FDA de chaque inhibiteur dans plusieurs types tumoraux (Ribas and Wolchok *et al.*, Science, 2018).

Figure 33 : Essais cliniques évaluant le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 en combinaison avec d'autres cibles thérapeutiques en 2020. Les cibles similaires sont regroupées et les nombres des essais en cours sont indiqués (Cancer research institute et clinicaltrials.gov, 2020).

Figure 34 : Caractérisation des LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux chez les patients et analyse de leur contribution à l'efficacité clinique du blocage de l'axe PD-1/PD-L1.

Figure 35 : Analyse des TIL CD4 spécifiques des Ag tumoraux et des mécanismes d'action du blocage de PD-1 sur ces cellules.

LISTE DES FIGURES

Figure 36 : Comparaison de l'expression des PCI et CD39 dans les TIL $\gamma\delta$, T CD8 et CD4 Tconv.

Figure 37 : Mécanismes d'action des AcM anti-PD-1 sur les LT CD8 et CD4 spécifiques des Ag tumoraux.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de cancers de l’ovaire (Stewart *et al.*, Gynecology Oncology, 2019).

Tableau 2 : Expression de CTA dans les tumeurs de différents types histologiques (Fratta *et al.*, Molecular oncology, 2011).

RÉSUMÉ

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) épuisés, sont caractérisés par l'expression de points de contrôle de l'immunité (PCI), par exemple PD-1. Une des approches majeures en immunothérapie, basée sur l'inhibition des PCI, s'est avérée efficace dans le contrôle de la progression tumorale dans plusieurs cancers. Malgré cette avancée, seule une proportion des patients en retire un bénéfice clinique. Afin d'améliorer les réponses à l'inhibition des PCI, il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans l'épuisement des TIL et d'élucider quels lymphocytes T (LT) sont capables de répondre à cette immunothérapie.

Au site tumoral, nous mettons en évidence que seuls les LT CD8 spécifiques des antigènes (Ag) tumoraux expriment quatre PCI ainsi que d'autres marqueurs d'épuisement et perdent la molécule de co-stimulation CD28, contrairement au LT CD8 spécifiques circulants. Les TIL CD8 spécifiques sont dysfonctionnels, néanmoins, ils possèdent un potentiel cytotoxique élevé et expriment des marqueurs de résidence. Nous montrons que l'inhibition de PD-1 a une double action sur les LT CD8 spécifiques. Elle rétablit leurs fonctions dans la tumeur et augmente leur prolifération dans la périphérie. De manière importante, l'infiltration des tumeurs par ces TIL spécifiques et épuisés est prédictive de la réponse à la thérapie et de la survie des patients traités par immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1. Les LT CD4 auxiliaires sont essentiels pour l'amorçage de la réponse T CD8. En revanche, leur rôle effecteur dans la tumeur a été moins étudié. Ici, nous montrons que les LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux, également épuisés au site tumoral, peuvent être identifiés par des marqueurs qui leur sont propres. Des similarités dans le programme d'épuisement des LT CD4 et CD8 ont été retrouvées. Le blocage de PD-1 sur les TIL CD4 rétablit leur activation, ce qui va permettre la maturation des cellules dendritiques et, par conséquent, l'augmentation de la prolifération des TIL CD8 spécifiques de la tumeur. Nos résultats révèlent que les TIL CD4 et CD8 spécifiques des Ag tumoraux épuisés peuvent être identifiés chez les patients par des marqueurs caractéristiques et qu'ils répondent à l'inhibition du PD-1 en rétablissant les fonctions des LT CD8 de manière directe et indirecte. Ces données identifient des biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie et positionnent les LT spécifiques des Ag tumoraux comme des acteurs de la réponse clinique à l'immunothérapie bloquant le PD-1.

ABSTRACT

Exhausted tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are characterized by immune checkpoint (IC) expression, for instance PD-1. One of the major immunotherapy approaches, based on IC inhibition, has proved efficient in the control of tumor progression in many cancers. Despite this progress, only a proportion of patients experience clinical benefit. To improve responses to IC inhibitors, understanding mechanisms involved in TIL exhaustion and investigating which T cells are able to respond to immunotherapy are required. We investigated both CD8 and CD4 T-cell exhaustion and its relation to tumor antigen (Ag) specificity and to responsiveness to IC inhibition in cancer patients.

We demonstrated that CD8 T-cell exhaustion at the tumor site was only attained by tumor Ag-specific cells that were characterized by the sequential acquisition of ICs and by CD28 loss. Their circulating counterparts expressed less ICs and at lower levels and were CD28⁺. Specific CD8 TIL were dysfunctional, nonetheless, they maintained high cytotoxic potential and expressed tissue residency markers. We showed that PD-1 inhibition has a dual effect on specific CD8 T cells. It rescued their effector functions at the tumor site and enhanced their proliferation in the periphery. Importantly, the quantity of exhausted and specific TIL was predictive of response to therapy and of survival in patients treated with PD-1-targeting immunotherapy. Assessment of CD4 TIL exhaustion underscored similarities with the CD8 exhaustion program, in particular their specificity for tumor Ag and sequential acquisition of ICs although ICs characterizing terminally exhausted CD4 TIL were different than those found in CD8 TIL. Importantly, PD-1 blockade on CD4 TIL restored their helper functions, leading to dendritic cell maturation and, consequently, increased tumor-specific CD8 T-cell proliferation.

Our data imply that under anti-PD-1/PD-L1, effector functions of terminally exhausted CD8 TIL is rescued and the tumor site is replenished by memory CD8 T cells which proliferate following direct blockade of PD-1 and through reinvigoration of the helper activity of tumor Ag-specific CD4 T cells. Our results position tumor Ag-specific T cells as major players of responsiveness to PD-1-blocking immunotherapy and identify predictive biomarkers of response to immunotherapy.

INTRODUCTION

I) L'immunité anti-tumorale

1. Tumorigénèse

1.1 Hallmarks du cancer

Le cancer est une maladie génétique chronique initiée par des changements dynamiques du génome des cellules saines qui se transforment en cellules tumorales. Ces altérations génétiques et épigénétiques produisent des oncogènes avec gain de fonction et des gènes suppresseurs de tumeur avec perte de fonction qui créent un dysfonctionnement cellulaire hors de contrôle. L'oncogenèse s'accompagne d'une accumulation de mutations, qui peuvent apporter un avantage sélectif aux populations de cellules cancéreuses en augmentant leur diversité génétique et en accélérant leur aptitude à évoluer. Ce processus implique plusieurs étapes qui permettent aux cellules tumorales de proliférer de manière incontrôlée. Dans la revue de référence parue en 2000, « The hallmarks of cancer », six principes communs et essentiels à la croissance maligne des tumeurs sont décrits¹ :

- Autosuffisance en signaux de croissance
- Échappement à l'apoptose
- Insensibilité aux signaux d'anti-croissance
- Angiogenèse soutenue
- Potentiel réplcatif sans limite
- Invasion des tissus et métastases

Les avancées scientifiques ont, par la suite, permis une caractérisation plus précise de la tumorigénèse. Dix ans plus tard, Hanahan et Weinberg ont complété leur revue et énoncent des capacités biologiques tumorales supplémentaires². Un grand nombre d'études suggèrent que deux autres caractéristiques sont impliquées dans la croissance tumorale. L'une d'entre elles concerne la capacité à modifier, ou à reprogrammer, le métabolisme cellulaire afin de soutenir le plus efficacement possible la prolifération néoplasique. La seconde permet aux cellules cancéreuses d'échapper à la destruction immunologique, en particulier par les lymphocytes T (LT), les

macrophages et les cellules tueuses naturelles (NK). Néanmoins, l'inflammation mise en place par les cellules immunitaires innées, normalement conçue pour combattre les agents infectieux, peut au contraire, en devenant chronique, soutenir les capacités tumorales.

1.2 Microenvironnement tumoral

Les cellules cancéreuses ne possèdent pas qu'une simple aptitude à proliférer de façon excessive, elles sont également capables de mettre en place un microenvironnement hétérogène et auto-suffisant qui soutient de manière efficace la progression du cancer. La collaboration étroite des cellules tumorales avec les cellules non transformées du milieu est cruciale pour participer continuellement au processus de tumorigenèse³. L'orchestration du microenvironnement tumoral (TME) implique notamment le recrutement de fibroblastes et de cellules immunitaires, le remodelage de la matrice extracellulaire et le développement de réseaux vasculaires⁴.

Le succès de la croissance des tumeurs dans leur microenvironnement n'est pas seulement déterminé par les altérations génétiques des cellules tumorales, mais aussi par l'avantage que ces mutations confèrent dans un environnement donné. L'identification de la variabilité génétique au sein d'une même tumeur suggère des événements complexes d'évolution variable. En effet, des différences régionales de pressions sélectives telles que l'hypoxie, l'acidité et la présence de facteurs de croissance existent au sein d'une tumeur et déterminent activement son développement. Ces paysages environnementaux distincts sélectionnent les mutations qui engendrent la survie et l'expansion, créant ainsi une hétérogénéité des cellules tumorales. Cette hétérogénéité tumorale, présente dans un microenvironnement complexe peut influencer la réponse thérapeutique et engendrer des résistances⁴.

L'évaluation des tumeurs en tant qu'organes complets, et non simplement en tant que masses de cellules épithéliales transformées, devient primordiale. En effet, elles contiennent de multiples types de cellules et des composants de la matrice extracellulaire et se développent grâce à des interactions complexes entre ces différents composants des tissus en utilisant des processus qui ressemblent souvent à ceux utilisés par les organes en développement. Les tumeurs interagissent avec le reste de l'organisme, de la même manière que les organes normaux⁵.

2. Les tumeurs solides

L'Europe totalise 23,4% du total des cas de cancer et 20,3% des décès par cancer dans le monde, bien qu'elle ne représente que 9% de la population mondiale (source GLOBOCAN,) ce qui représente un problème majeur de santé publique nécessitant un besoin d'améliorer la détection, les facteurs ou marqueurs prédictifs et pronostiques et les thérapies. Les tumeurs solides, comme les carcinomes ou les sarcomes, représentent la majorité des cancers, elles sont repérables par un amas de cellules localisé et se distinguent des cancers des cellules sanguines, comme les leucémies, dont les cellules cancéreuses circulant dans le sang ou la lymphe sont dispersées dans l'organisme.

2.1 Cancer des VADS

Le cancer de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL), aussi nommé cancer de la tête et du cou, est une maladie qui se développe dans l'un des organes formant les voies aérodigestives supérieures (VADS). Les cancers des VADS peuvent être de différents types histologiques. Dans mon travail de thèse, l'accent est mis sur les carcinomes épidermoïdes qui représentent plus de 90% des cancers des VADS⁶. Ils peuvent être initiés à partir des muqueuses de quatre sites anatomiques : la cavité buccale, la cavité nasale, le pharynx et le larynx (Figure 1). L'examen clinique et l'imagerie servent au diagnostic et sont complétés par une biopsie⁷. Le pronostic et les options thérapeutiques varient en fonction de facteurs cliniques, de la localisation anatomique et du stade, ils nécessitent une décision pluridisciplinaire⁸. Le cancer des VADS représente le septième cancer le plus fréquent dans le monde en 2018 (890 000 nouveaux cas et 450 000 décès)⁹. Généralement diagnostiqués chez des patients âgés en association avec une forte consommation de tabac et d'alcool, ils diminuent lentement à l'échelle mondiale, en partie en raison de la diminution de la consommation de tabac^{10,11}. À l'inverse, le cancer des VADS associé au virus du papillome humain (HPV) sexuellement transmissible, initié principalement dans l'oropharynx (composant du pharynx) par le HPV de type 16, est en augmentation, surtout chez les jeunes hommes (<60 ans) en Amérique du Nord et en Europe du Nord^{11,12}. En effet, dans le monde, la prévalence globale du HPV dans les cancers de l'oropharynx passe de 40,5 % avant les années 2000, à plus de 72,2% après 2005¹³.

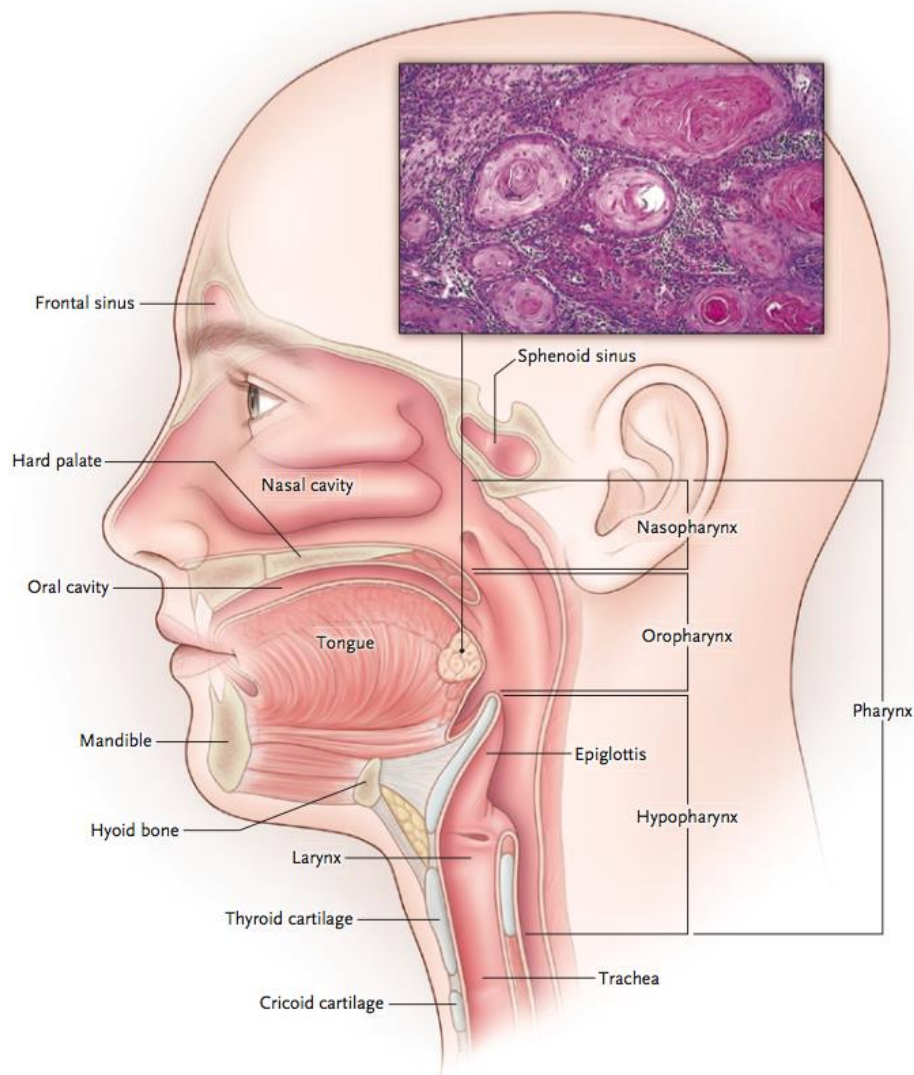


Figure 1 : Sites anatomiques des cancers des VADS (Chow, NEJM, 2020)⁸.

Le pronostic est plus favorable pour les patients atteints d'un cancer oropharyngé associé au HPV, qui présentent une meilleure réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie que les patients atteints d'une maladie non causée par le HPV¹⁴.

La classification TNM (tumeur, ganglion, métastase) est utilisée pour déterminer le stade des cancers afin d'évaluer le pronostic et d'adapter la thérapie¹⁵. Cette classification diffère à chaque site anatomique. Celle du cancer oropharyngé associé au HPV possède, depuis 2017, un système de classification indépendant dû à son meilleur pronostic^{15,16}. L'évaluation du statut HPV est réalisée par les techniques d'hybridation *in situ* et de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour identifier l'ADN du HPV ou la charge virale ou par des tests immunohistochimiques pour détecter l'expression de la protéine p16, qui est un marqueur de substitution de la positivité du HPV¹⁷.

Environ 30 à 40 % des patients atteints de cancer des VADS sont à un stade précoce (stade TNM I ou II), ils peuvent être traités par chirurgie seule ou par radiothérapie seule, qui peuvent améliorer les taux de survie à long terme chez environ 70 à 90 % des patients¹⁸. Plus de 60 % des patients présentent une maladie de stade TNM III ou IV, qui se caractérise par une tumeur volumineuse avec une invasion locale souvent accompagnée de métastases aux ganglions lymphatiques (LN) régionaux. La maladie localement avancée a un risque élevé de récurrence locale (15 à 40 %) et est associée à un mauvais pronostic (survie globale à 5 ans, < 50 %)¹⁹. La résection chirurgicale est préférable pour les cancers de la cavité buccale, suivie d'une radiothérapie ou d'une thérapie systémique radiosensibilisante concomitante à une radiothérapie adjuvante (radio-chimiothérapie). Dans les autres sites, la chirurgie est généralement réservée aux tumeurs primaires plus petites et accessibles. Lorsque la résection chirurgicale est difficilement réalisable ou risque d'entraîner de mauvais résultats fonctionnels à long terme, la radio-chimiothérapie concomitante est préférée chez les patients non âgés^{20–22}. L'amélioration de l'administration de la radiothérapie et l'introduction de la radio-chimiothérapie ont amélioré la survie des patients et surtout de ceux atteints d'un cancer oropharyngé associé au HPV¹⁴. A partir du 1^{er} janvier 2021, le vaccin prophylactique actuellement disponible pour les jeunes filles afin de lutter contre le cancer du col de l'utérus, sera également étendue à tous les jeunes garçons de 11 à 14 ans pour la prévention des cancers de l'oropharynx, de l'anus et du pénis induits par le HPV (source INCa).

2.2 Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est une maladie rare^{23,24} avec un taux de survie globale à 5 ans de 48,6%^{24,25} qui est le plus faible parmi les cancers gynécologiques. En 2018, il était le 7^{ème} cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, avec environ 240 000 nouveaux cas²⁴. Le cancer de l'ovaire est rare chez les jeunes femmes, le risque augmente avec l'âge et il est plus élevé chez les femmes blanches non hispaniques²⁴. Ce type de tumeur reste asymptomatique jusqu'à des stades très avancés. À ce moment-là le diagnostic est établi sous forme de carcinose péritonéale dans 90% des cas, c'est à dire que les cellules cancéreuses se sont disséminées dans une large partie du péritoine^{26,27}.

Le pronostic est directement lié au stade de la maladie au moment du diagnostic^{25,27}. Les patientes qui sont diagnostiquées au stade précoce ont un taux de survie à cinq

ans de 90%, mais elles représentent une minorité. Chez les femmes atteintes d'une maladie localement avancée au niveau de la cavité abdominale le taux tombe à environ 80% et à 25% chez celles qui souffrent d'une maladie métastatique, c'est à dire avec extension extra-abdominale^{24,28}. Des études récentes ont mis en évidence que les cancers de l'ovaire les plus fréquents (adénocarcinomes séreux de haut grade), ne sont généralement pas initiés dans les ovaires. Mallen et al.²⁹ montrent que la plupart trouvent leur origine dans les trompes de Fallope. Les cancers de l'ovaire séreux de haut grade, des trompes de Fallope et du péritoine ont des profils moléculaires semblables et sont considérés comme une même maladie.

Il existe trois principaux types de tumeur de l'ovaire : le cancer épithélial (>90 %), le cancer des cellules germinales et la tumeur des cordons sexuels²⁷. Parmi les cancers épithéliaux ou adénocarcinomes, on compte quatre principaux sous-types histologiques : séreux (haut grade, 70 à 80 %; bas grade, <5%), endométriode, mucineux et à cellules claires^{26,27} (Tableau 1). L'adénocarcinome séreux de haut grade étant le cancer de l'ovaire le plus fréquent, nous l'avons utilisé comme modèle dans nos travaux.

Il existe des facteurs de risque et des facteurs de protection établis pour le cancer de l'ovaire. Parmi les facteurs de risque génétiques, on retrouve des antécédents familiaux de cancer de l'ovaire, du sein, de la prostate et du pancréas ainsi que des mutations des gènes BRCA 1 et 2 et d'un gène MMR (mismatch repair) qui peuvent augmenter le risque de 1,6 % à respectivement 40 %, 18 % et 10 %^{23,30}. L'ovulation a également un lien direct avec le risque de cancer des ovaires³¹. Il a été montré que les facteurs qui interrompent l'ovulation, tels que l'utilisation de contraceptifs, l'apparition précoce des règles, la grossesse, l'allaitement et la ménopause précoce, sont des facteurs de protection^{23,25,26,31}. L'endométriose a été liée à 5 à 15 %^{27,29} des cancers ovariens épithéliaux chez les jeunes femmes, ces cancers ont un meilleur pronostic global. D'autres facteurs comme les thérapies hormonales de substitution, le tabac et le poids sont également impliqués^{32,33 34}. Chez les patientes qui ont un risque élevé, la salpingo-ovariectomie bilatérale (ablation des trompes et des ovaires), qui réduit l'incidence du cancer chez les porteuses de mutations du gène BRCA jusqu'à 80%³⁵, ou la ligature des trompes de Fallope, peuvent être envisagées.

Lorsqu'un cancer de l'ovaire est suspecté, les patientes subissent un examen clinique centré afin de détecter des nodules ou masses abdominales et/ou un liquide dans l'abdomen appelé ascite. Néanmoins, il n'existe encore aucun moyen efficace de

dépister le cancer de l'ovaire. L'échographie endovaginale, associée au test du marqueur CA125, peuvent aider à établir une suspicion clinique et guider les prochaines étapes^{23,36}. Cependant, un véritable diagnostic est établi par une biopsie réalisée par chirurgie seule ou radio-guidée³⁷. La classification du stade des cancers de l'ovaire est similaire à celle d'autres cancers, étant classée dans les stades I à IV selon l'échelle générée par la fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique (FIGO)^{38,39}.

Cancers épithéliaux	Séreux	Bas grade 10% de tous les cancers de l'ovaire Diagnostiqué à un jeune âge Meilleur pronostic que les séreux de haut grade
		Haut grade 90% de tous les cancers de l'ovaire Pronostic le plus fatal Taux de mortalité à 10 ans : 70%
	Endométrioïde Originaire de l'endométriose Bon pronostic	
	Mucineux Moins commun des cancers épithéliaux Associé avec métastases de la trachée gastro-intestinale	
	Cellules claires 10% des cancers épithéliaux Souvent diagnostiqué à des stades précoces Mauvais pronostic si diagnostiqué tardivement	
Cancer des cellules germinales	Rare 3% des cancers de l'ovaire Fréquemment diagnostiqué chez les femmes jeunes Type histologique similaire à celui des tumeurs des cellules germinales chez l'homme	
Tumeur des cordons sexuels	Moins commune des tumeurs de l'ovaire < 2% des tumeurs primaires de l'ovaire Tumeur rarement maligne Principalement diagnostiqué tôt Le tabac peut diminuer le risque	

Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de cancers de l'ovaire (Adapté de Stewart *et al.*, Gynecology Oncology, 2019)³⁶.

Les traitements du cancer de l'ovaire reposent sur la chirurgie et la chimiothérapie à base de sels de platine. Plus récemment, les inhibiteurs de PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase)⁴⁰ ont été acceptés comme traitement de 1^{ère} ligne chez les patientes qui présentent une mutation BRCA. Le traitement de première intention est la cytoréduction complète par chirurgie. Cette technique permet la destruction/exérèse de toute la maladie macroscopiquement visible. Si cette option n'est pas faisable du

fait d'une altération de l'état général de la patiente ou d'une chirurgie potentiellement morbide, un traitement par chimiothérapie est alors débuté. La décision est généralement prise après la réalisation d'une laparoscopie ou cœlioscopie exploratoire. Cette technique permet d'accéder à la cavité abdominale par chirurgie peu invasive qui consiste en deux incisions infra-centimétriques permettant notamment l'insertion d'un endoscope et d'outils chirurgicaux. Elle permet de prélever des biopsies et de déterminer la charge tumorale et les organes touchés par la maladie. La chirurgie de cytoréduction implique généralement au moins une salpingo-ovariectomie bilatérale ainsi qu'une ablation de l'utérus (hystérectomie) et de l'épiploon (tissu graisseux attaché à certains organes de la cavité péritonéale) et des gestes de péritonectomie associés. Elle doit être la plus complète possible, le but étant de parvenir à l'absence de résidu tumoral car le pronostic de la patiente est fortement lié à la quantité de tumeur restante²⁷. Dans le cas des jeunes femmes atteintes d'une maladie à un stade très précoce qui souhaitent préserver leur fertilité, seuls les ovaires et les trompes de Fallope peuvent être retirés. Dans le cas de maladie avancée, la cytoréduction consiste souvent à enlever des parties des autres organes abdominaux. Également, une chimiothérapie peut être administrée avant l'opération afin de réduire la charge tumorale, cependant la survie globale des patientes est inférieure en comparaison aux patientes qui ont subi une chirurgie de première intention^{37,41}. La chimiothérapie administrée directement dans l'abdomen (chimiothérapie intrapéritonéale (CHIP)) peut être envisagée dans certains cas mais son utilisation reste controversée.^{42,43}

La récurrence est très courante et une résistance à la chimiothérapie standard à base de sels de platine est également fréquente⁴⁴. Il existe un nombre croissant d'options de traitement pour la récurrence, y compris d'autres médicaments de chimiothérapie ou des thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de PARP. En général, la récurrence montre des signes cliniques qui s'accompagnent d'une élévation du CA125⁴⁵. La chirurgie de cytoréduction secondaire est aussi une option chez certaines patientes^{46,47}.

2.3 Cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus représente le quatrième cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, on estime à 570 000 nouveaux cas par an, avec 311 000 décès en 2018 (World Health Organization). Avec une détermination du stade et un traitement adapté, le taux de contrôle local à trois ans est de 87 à 95% à un stade

précoce et de 74 à 85% à un stade avancé^{48,49}. Par manque de dépistage et de vaccination contre le HPV, environ 90% des décès dus au cancer du col de l'utérus se produisent dans les pays sous-développés ou en développement⁵⁰.

Le col utérin est le point de communication entre l'utérus et le vagin, il comprend deux parties : le canal endocervical (ou endocol) dans la partie haute et l'exocol près du vagin (Figure 2). C'est à la limite de l'endocol et l'exocol, appelée zone de jonction, où prennent naissance la plupart des cancers. Les tumeurs qui apparaissent dans l'épithélium malpighien de l'exocol sont plus fréquentes (environ 75%) et sont le plus souvent des carcinomes épidermoïdes. En revanche, les tumeurs initiées dans l'épithélium glandulaire de l'endocol sont plus susceptibles d'être des adénocarcinomes.

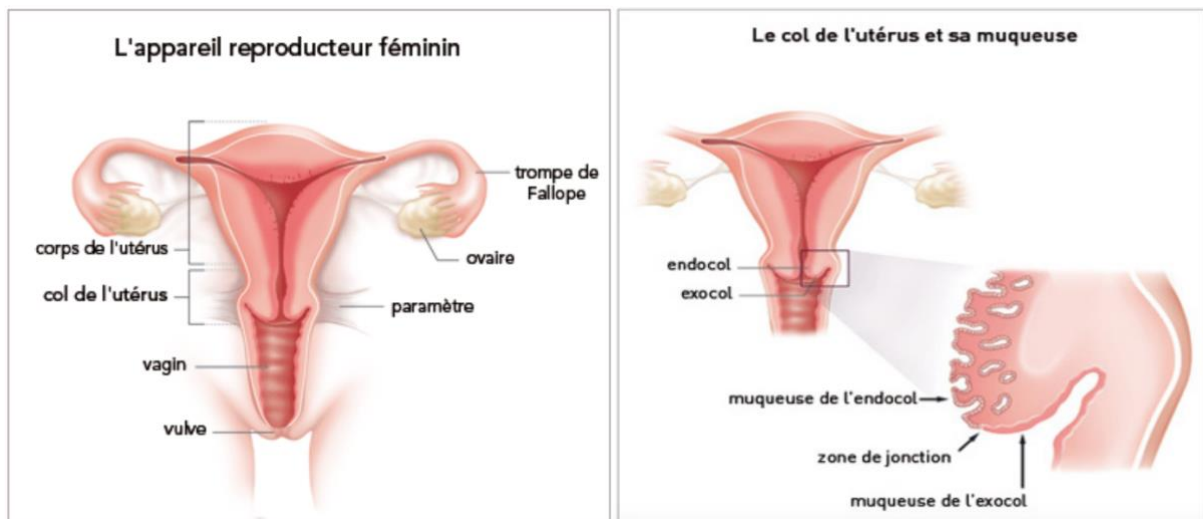


Figure 2 : Représentation de l'appareil reproducteur féminin (INCa).

La majorité des cas de cancer du col de l'utérus résultent d'une infection par le HPV⁵¹, l'ADN du HPV étant identifié dans environ 95 % des lésions cervicales malignes. Il existe différents types de HPV, treize sont cancérogènes, parmi eux, les HPV16 et 18 sont impliqués dans 70% des cancers du col de l'utérus⁵². La majorité des infections à HPV sont transitoires et disparaissent spontanément. Toutefois, dans environ 10% des cas, le virus persiste et peut provoquer des lésions précancéreuses, susceptibles d'évoluer vers un cancer. Les lésions précancéreuses sont appelées néoplasies cervicales intraépithéliales ou CIN. Elles sont classées selon le degré de désorganisation de l'épithélium, on retrouve les lésions de bas grade (CIN1) qui

régressent généralement et de haut grade (CIN2 et 3) qui ont une plus forte probabilité d'évolution vers un cancer invasif.

Depuis 2006, un vaccin prophylactique montrant une efficacité supérieure à 93%⁴³ est proposé dans les pays développés pour les jeunes filles âgées de 11 à 14 ans (avant les premiers rapports sexuels). Deux vaccins formulés à partir des types 16 et 18 du HPV, ont été produits, chacun utilisant un adjuvant différent. L'un était bivalent (types 16 et 18) et l'autre quadrivalent pour inclure en plus les types responsables des verrues génitales (types 6 et 11)^{53,54}. Néanmoins, même chez les femmes vaccinées, le dépistage est indispensable puisque les vaccins actuellement disponibles ne couvrent pas tous les types cancérogènes du virus. Les conditions de vaccination ont aujourd'hui évolué, les schémas de vaccination originaux étaient basés sur 3 doses (administrées à 0, 2 et 6 mois), récemment, il a été démontré que 2 doses étaient aussi efficaces que 3 doses⁵⁵. La production d'un vaccin plus complet qui ajoute les types 31, 33, 45, 52 et 58 au vaccin quadrivalent a démontré son efficacité lors d'essais de phase 3^{56,57}. Lorsqu'un cancer du col de l'utérus est suspecté, des biopsies sont réalisées au niveau des lésions et le diagnostic est confirmé par analyse anatomopathologique. L'étendue de la maladie est déterminée grâce à des examens d'imagerie et le stade est décrit selon la classification de la FIGO révisée en 2018^{58,59}. On distingue 4 stades qui sont répartis selon les stades précoces (IA, IB et IIA), les stades localement avancés (IIB, III et IVA) et le stade avancé (IVB).

Le choix du traitement sera en fonction du stade du cancer. La chirurgie, la radiothérapie (externe ou curiethérapie) et la chimiothérapie peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Pour les stades précoces (tumeur < 4cm), la chirurgie est recommandée. L'intervention la plus fréquemment réalisée est la colpo-hystérectomie élargie qui consiste en l'ablation de l'utérus, des paramètres et de la partie supérieure du vagin. Généralement, les ovaires et les LN du pelvis (curage ganglionnaire) sont également retirés. Pour les tumeurs plus volumineuses (> 4cm) ou localement avancées, le traitement de référence est la radio-chimiothérapie concomitante qui associe une radiothérapie externe, une chimiothérapie et une curiethérapie (source radioactive placée directement au contact de la tumeur)⁶⁰. Cette combinaison a pour avantage de renforcer l'action respective de chacun des traitements. En effet, la chimiothérapie rend les cellules plus sensibles aux rayonnements et l'action combinée de la curiethérapie et de la radiothérapie externe permet de cibler de manière plus précise la tumeur et de préserver au mieux les tissus sains. Cependant, dans le cas

du cancer localement avancé, environ 30% des patientes présenteront une récurrence locale dans les deux premières années après la fin du traitement.

3. Immunosurveillance du cancer

3.1 Historique : Mise en évidence de l'immunité anti-tumorale

La présence d'une réponse immune anti-tumorale n'est pas intuitive puisque ce sont nos propres cellules qui sont à l'origine de la maladie. Néanmoins, notre système immunitaire (SI) est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules anormales au fonctionnement aberrant. La découverte de l'immunité anti-tumorale a débuté dans les années 1890, lorsque le Dr. W. Coley a remarqué des régressions tumorales chez des patients qui étaient également atteints d'une maladie infectieuse. Il a injecté la bactérie responsable de cette infection à l'un de ces patients cancéreux ce qui a entraîné une régression totale de la tumeur^{61,62}. Au début du XXe siècle, P. Ehrlich a été l'un des premiers à concevoir l'idée que le SI réprime le développement tumoral. Cinquante ans plus tard, L. Thomas et F. Macfarlane Burnet émettent l'hypothèse que le SI reconnaît les tumeurs grâce à l'expression de néo-antigènes (néoAg) tumoraux spécifiques sur les cellules tumorales et les élimine en maintenant l'homéostasie tissulaire. Ils proposent le concept d'immunosurveillance⁶³. Cependant, cette idée est longtemps restée controversée par manque de preuves expérimentales, elle a depuis été validée par un grand nombre d'études.

Dans les modèles murins, la génération de souris immunodéficientes dans les années 1990 a permis de mettre en évidence le rôle de l'immunité anti-tumorale spécifique. En effet, aucune différence dans le développement des tumeurs primaires n'a été constatée entre les souris « nude » ou athymiques et les souris de type sauvage^{64–66}. Les souris nude ne sont pas totalement dépourvues de LT fonctionnels^{67,68}, ils sont capables de produire deux composants du SI : l'interféron γ (IFN- γ) et la perforine. Toutefois, les souris dépourvues d'immunité adaptative RAG 2 (Recombination Activating Gene 2) ^{-/-} sont plus susceptibles à la formation de tumeurs primaires que des hôtes sauvages. De plus, la croissance des tumeurs générées dans des souris immunodéficientes est fortement diminuée après transplantation dans des hôtes immunocompétents⁶⁹. Les tumeurs de souris RAG 2 ^{-/-} sont significativement plus immunogènes que les tumeurs de souris sauvages. Ces dernières ont leur SI qui a

détruit les cellules tumorales sensibles à l'immunosurveillance et sélectionné les cellules plus résistantes.

L'immunosurveillance du cancer a aussi été mise en évidence chez les patients. En 2003, une étude rapporte un cas de mélanome fatal qui avait été transféré dans un rein donné et qui est survenu alors que le donneur avait subi une résection de mélanome primaire 16 ans auparavant et avait été déclaré en rémission complète⁷⁰. D'autre part, le traitement d'immunosuppression après transplantation d'organe a été associée à un risque augmenté de cancer par rapport à des individus sains ou en attente de transplantation⁷¹. La similitude du schéma d'augmentation du risque de cancer chez des patients infectés par le VIH suggère qu'il s'agit d'un déficit immunitaire, plutôt que d'autres facteurs de risque, qui est responsable de l'augmentation de l'incidence de cancer⁷². Des Ag tumoraux ont pu être identifiés chez les patients et permettent une discrimination des cellules saines et cancéreuses par les LT⁷³. De plus, les LT infiltrant la tumeur (TIL) ont été identifiés par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs de patients^{74,75}.

3.2 Généralités sur la réponse immunitaire dans le cancer

La réponse immunitaire a pour but de : (i) faciliter la cohabitation avec les micro-organismes bénéfiques qui constituent le microbiote, (ii) fournir une défense contre les agents infectieux, (iii) éliminer les cellules cancéreuses et (iv) initier des processus de réparation et de remodelage qui maintiennent l'homéostasie des tissus⁷⁶. Le SI est organisé selon deux axes principaux : l'immunité innée et l'immunité adaptative⁷⁷. Bien que ces deux composantes diffèrent principalement en termes de spécificité, rapidité, durée et fonctions effectrices, elles sont néanmoins complémentaires. Alors que la réponse innée est rapide mais endommage parfois les tissus par manque de spécificité, la réponse adaptative est précise, mais prend plusieurs jours ou semaines à se développer. La réponse adaptative génère une mémoire, de sorte que l'exposition ultérieure entraîne une réponse plus vigoureuse et plus rapide, elle assure une protection durable.

L'immunité innée fait intervenir divers types de cellules de la lignée myéloïde, comme les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les mastocytes et de la lignée lymphoïde, notamment les cellules lymphoïdes innées (ILC), telles que les cellules NK^{78,79}. Dans le cancer, les cellules immunitaires innées

assurent une réponse immédiate, elles sont capables de détecter les altérations moléculaires des cellules tumorales^{78,80,81}. Ces cellules déclenchent ensuite des réponses immunitaires adaptatives tout en mettant en place leurs propres réponses effectrices, telles que la phagocytose pour les macrophages et les granulocytes, et la cytotoxicité naturelle pour les cellules NK^{78,79}. En parallèle, le système du complément est activé et contribue à la création de l'inflammation⁷⁶. Les réponses inflammatoires augmentent également le flux d'Ag des tissus infectés vers les LN, un mécanisme qui aidera à mettre en place une réponse immunitaire adaptative. De multiples tentatives ont été faites pour manipuler les réponses immunitaires innées dans le cancer. Cependant, elles n'ont conduit qu'à des données précliniques ou à des résultats prometteurs seulement dans les premiers essais cliniques⁸¹.

La réponse immune adaptative anti-cancéreuse est spécifique, elle est assurée par les LT CD8 cytotoxiques (CTL), les LT CD4 auxiliaires et les lymphocytes B (LB) et plasmocytes. Les CTL sont capables de reconnaître un Ag tumoral présenté par une cellule cancéreuse, ce qui va permettre l'élimination directe de cette cellule par le lymphocyte activé. Le rôle clef des LT dans l'immunité anti-tumorale a été démontré par la corrélation positive entre l'infiltration par des lymphocytes au niveau du site de la tumeur et le bon pronostic des patients^{82,83}. De plus, le succès clinique des thérapies manipulant ces cellules dans le but d'induire ou d'amplifier la réponse immune adaptative anti-cancéreuse, a confirmé le rôle primordial des LT dans l'élimination de la tumeur^{84–86}. L'interaction entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dans le cancer peut être illustrée par le rôle des cellules présentatrices d'Ag (CPA) dans le déclenchement de la réponse LT spécifique des Ag tumoraux⁸⁷. Il est à noter que les CTL ne sont pas autonomes dans leurs fonctions. L'amorçage et le maintien des fonctions effectrices et le développement de LT CD8 mémoires dépendent de l'étroite collaboration avec les réponses immunitaires innées et les LT CD4^{78,88}. D'autre part, la réponse humorale, basée sur la production d'immunoglobulines (Ig) spécifiques des Ag tumoraux par les plasmocytes, dérivés des LB, a été identifiée dans plusieurs cancers^{89–91}. La présence de LB dans les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) a également été associée à une immunité protectrice dans le cancer⁹².

Afin de renforcer l'immunité adaptative spécifique du cancer, il est primordial de connaître les différents mécanismes nécessaires à l'élaboration de cette réponse anti-cancéreuse. Dans mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée aux réponses adaptatives T spécifiques des Ag tumoraux qui, malgré l'implication de

nombreuses autres cellules immunitaires dans l'activité anti-cancéreuse, sont des acteurs centraux de l'élimination des cellules tumorales.

3.3 Cycle de l'immunité spécifique anti-cancer

Pour qu'une réponse immunitaire adaptative anti-cancéreuse conduise à la destruction efficace des cellules cancéreuses, une série d'événements doit être enclenchée (Figure 3)⁸⁵.

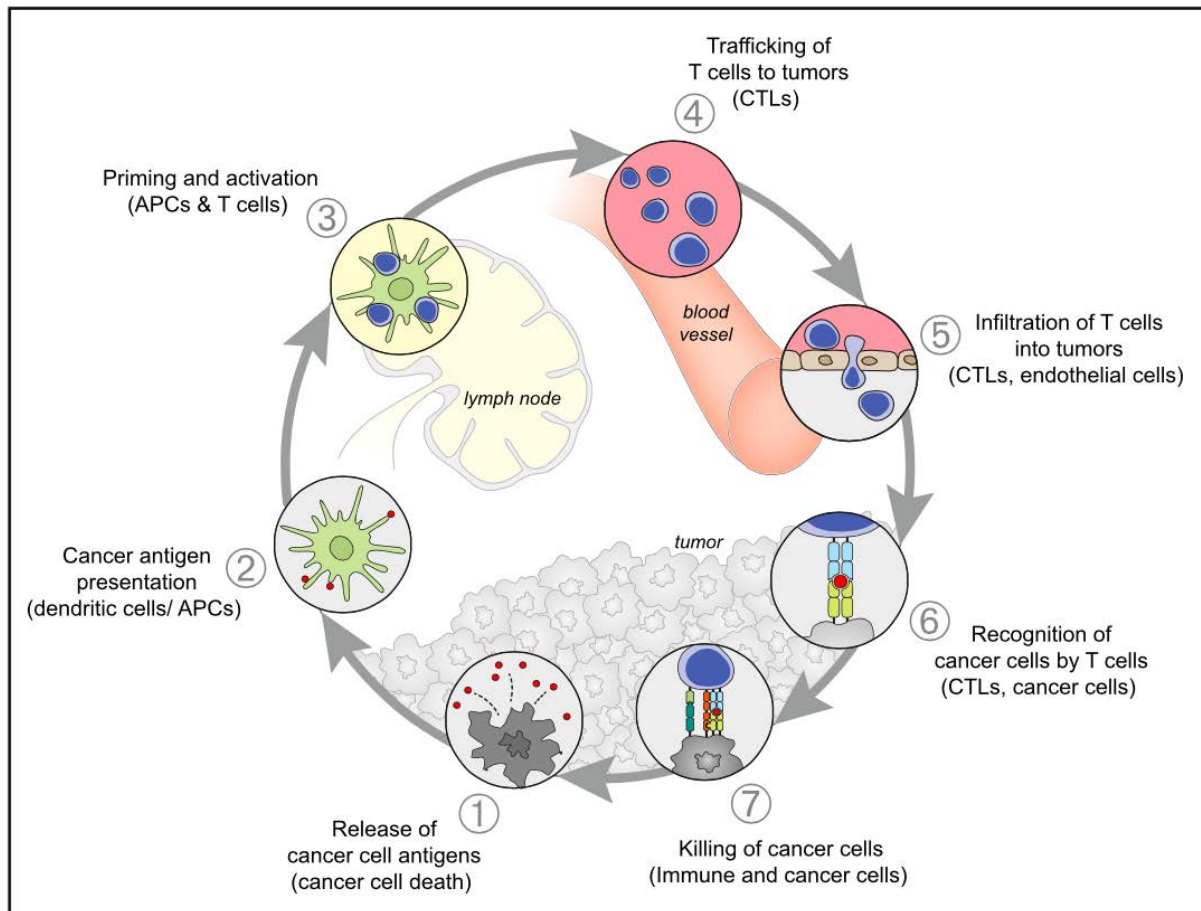


Figure 3 : Cycle de l'immunité spécifique anti-cancer (Chen et Mellman, Immunity, 2013)⁸⁵.

Dans la première étape, les Ag créés le long du processus oncogénique sont capturés par les DC au sein de la tumeur. En parallèle, les DC reconnaissent des signaux de danger permettant leur maturation. Ensuite, les DC migrent jusqu'aux LN et présentent les Ag capturés aux LT via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (étape 2), ce qui entraîne l'activation et la différenciation des LT spécifiques des Ag tumoraux (étape 3). Les LT mémoires et effecteurs migrent *via* la lymphe puis la circulation sanguine (étape 4) et infiltrent la tumeur (étape 5). Les LT CD8 en particulier, se

différenciant en CTL, reconnaissent les cellules cancéreuses puisqu'elles présentent à leur surface le peptide antigénique tumoral à l'aide de molécules du CMH de classe I. Les LT spécifiques de cet Ag, se lient par l'intermédiaire de leur récepteur des LT (TCR) au complexe peptide/CMH (étape 6), et tuent la cellule cancéreuse cible (étape 7). La destruction de la cellule cancéreuse libère des Ag tumoraux supplémentaires (étape 1 à nouveau) pour augmenter l'ampleur de la réponse lors des mises en marche ultérieures du cycle. Cependant, des facteurs inhibiteurs peuvent interrompre le cycle et stopper ou limiter l'immunité anti-cancéreuse⁹³.

4. Antigènes tumoraux

L'idée que les LT puissent reconnaître des Ag générés dans les cellules cancéreuses autologues est née dans les années 1980. Les travaux de T. Boon ont permis d'identifier les premiers épitopes tumoraux reconnus par les LT chez la souris^{94–96}. Chez l'Homme, après avoir établie des lignées tumorales humaines *in vitro* ainsi que des clones de CTL autologues spécifiques de la tumeur, des tests de reconnaissance sont réalisés. Ils sont validés par lyse de la cellule tumorale et sécrétion de cytokines par les CTL⁹⁷. Ces clones de CTL ont ensuite été utilisés pour disséquer les différents Ag présents dans la tumeur dans des expériences d'immunosélection. Cette technique consiste à sélectionner des sous-lignées clonales de tumeur qui ne sont pas tuées par les CTL afin d'obtenir des variantes de perte d'Ag qui acquièrent des résistances à certains clones CTL, tout en restant sensibles à d'autres clones CTL. Ces résultats ont indiqué la présence de plusieurs Ag distincts au sein d'une même lignée de mélanome⁹⁸. Pour identifier ces Ag, une banque de cosmides préparés avec l'ADN de la lignée parentale de mélanome a été générée et ces cosmides ont été transfectés dans les cellules tumorales variante de perte. En 1991, cela a conduit à l'identification du premier gène humain, appelé *MAGEA1*, qui codait pour un Ag tumoral reconnu par les LT. Cet Ag n'est pas exprimé dans les tissus sains et a été identifié dans différentes lignées de mélanomes et dans d'autres types de tumeurs⁷³.

En 1995, une analyse sérologique des banques d'expression d'ADNc (ADN complémentaire) recombinant (SEREX) a été mise au point. Celle-ci utilise des banques d'ADNc tumoral exprimés dans des bactéries et les protéines obtenues sont mises en contact de sérums de patients atteints de cancer. Lorsque des anticorps (Ac) de patients se lient à des protéines tumorales, celles-ci sont identifiées par séquençage de l'ADN de la bactérie concernée⁹¹. Cela a conduit à l'identification de

plusieurs gènes codant pour des Ag tumoraux, tels que SSX-1, SSX-2⁹⁹ et NY-ESO-1¹⁰⁰.

Une approche biochimique, basée sur l'élution acide des peptides antigéniques liés aux molécules du CMH, a permis d'identifier un Ag dérivé de la protéine de différenciation mélanocytaire GP100¹⁰¹.

Par la technique d'immunologie inverse, des algorithmes ont été mis au point pour sélectionner des peptides qui sont susceptibles de se lier à une molécule du CMH¹⁰². Les peptides candidats sont synthétisés et leur liaison au CMH ainsi que la reconnaissance du peptide, présenté par des CPA ou des cellules tumorales, par des clones de LT sont testés *in vitro*. Plusieurs peptides antigéniques qui sont reconnus par les LT CD4 ou CD8 ont été identifiés grâce à ces approches^{103–107}.

Basé sur les transformations génétiques, épigénétiques, transcriptionnelles ou post-traductionnelles des cellules cancéreuses, il existe différentes classes d'Ag tumoraux reconnus par les LT. La plupart d'entre eux sont spécifiques des tumeurs : c'est-à-dire présents au niveau des cellules tumorales et absents des cellules saines (néoAg, Ag viraux). D'autres ont une faible spécificité tumorale, ils peuvent être normalement exprimés dans certains tissus sains mais de manière aberrante dans les cellules cancéreuses (Ag surexprimés, Ag de la différenciation, cancer testis antigens (CTA))⁹⁶ (Figure 4).

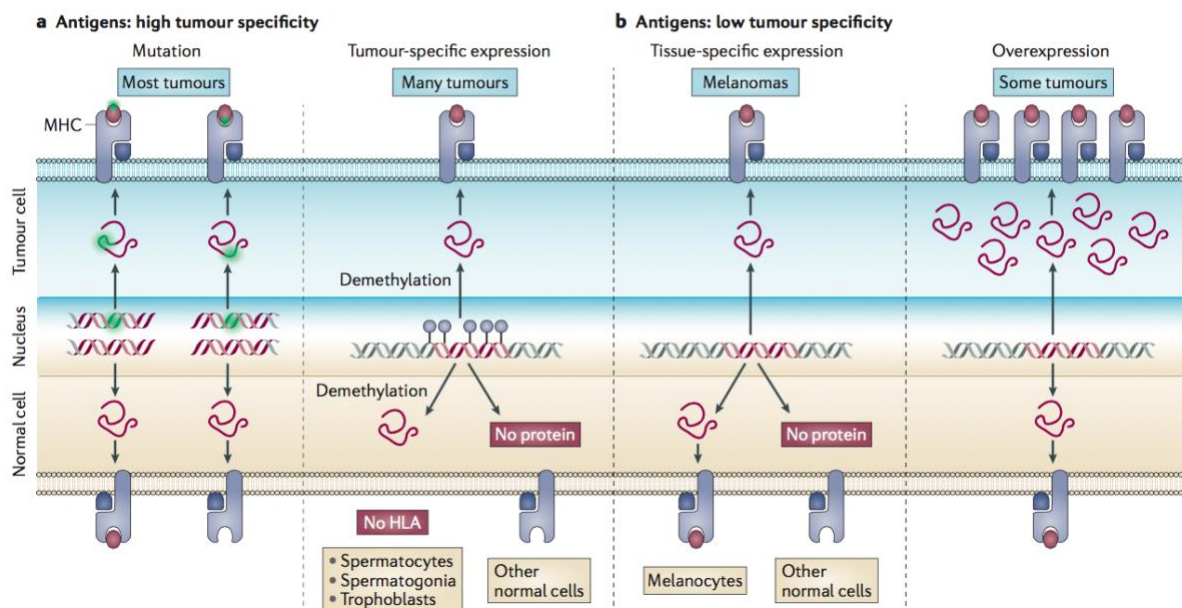


Figure 4 : Classes d'Ag tumoraux reconnus par les LT (Coulie *et al.*, Nature review, 2014)⁹⁶.

4.1 Antigènes surexprimés

La surexpression des protéines dans les tumeurs peut permettre une réponse T spécifique. Cependant, il est difficile d'établir leur surexpression par rapport aux cellules saines ainsi que le seuil d'expression en dessous duquel le CTL ne reconnaîtra pas l'Ag. Plusieurs peptides tumoraux dérivés de gènes surexprimés ont été identifiés, la plupart en utilisant l'approche de l'immunologie inverse¹⁰⁸. Parmi eux ; ceux dérivés du gène MOK et reconnus par des CTL dans le carcinome à cellules rénales¹⁰⁹, ainsi que des peptides dérivés de l'inhibiteur d'apoptose survivin^{110,111} et de la protéine p53^{112,113}. Comme les Ag surexprimés sont communs à de nombreuses tumeurs, ils représentent des cibles intéressantes pour le développement de thérapies. L'oncogène et récepteur de facteur de croissance HER2 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs épithéliales telles que les carcinomes des ovaires et du sein¹¹⁴⁻¹¹⁶. L'efficacité du traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein par le trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal (AcM) bloquant HER2, a été largement démontrée, même si son mécanisme d'action est essentiellement lié à son effet inhibiteur de l'activité oncogénique de HER2. Le gène qui code pour la protéine Wilms tumor 1 (WT1) est exprimé à un niveau 10 à 1000 fois plus élevé dans les cellules leucémiques que dans les cellules normales^{117,118}. Des patients atteints de leucémie ont reçu une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques, suivie d'une injection de clones CTL provenant de donneurs qui ont reconnu WT1 et une diminution du nombre de cellules leucémiques a été observée¹¹⁹. Toutefois, leur ciblage n'est pas sans risque de développer des réactions auto-immunes en raison de l'expression faible mais encore détectable des gènes correspondants dans les tissus sains.

4.2 Antigènes de différenciation

Les Ag de différenciation sont impliqués dans la différenciation mélanocytaire et présents dans le mélanome¹²⁰. Il s'agit de protéines souvent impliquées dans la biosynthèse de la mélanine ou la biogenèse des mélanosomes (organites dans lesquels la mélanine est synthétisée). L'expression des gènes correspondants dépend du facteur de transcription MITF (microphthalmia associated transcription factor)¹²¹. Ces Ag sont immunogènes, des réponses spécifiques T CD4 et CD8 ont été identifiées chez des patients porteurs de tumeurs qui les expriment¹²². Il est intéressant de noter que des réponses immunes spontanées dirigées contre les peptides dérivés de

protéines telles que la tyrosinase^{123,124}, gp100^{125–127}, Melan-A/MART-1^{128,129}, TRP-1¹³⁰ ou TRP-2¹³¹ sont fréquentes chez les patients atteints de mélanome^{132–134}. En clinique, un transfert adoptif de CTL anti-Melan-A a permis la régression de métastases cérébrales de mélanome¹³⁵. Des peptides ont également été identifiés à partir de l'Ag spécifique de la prostate et de la phosphatase acide prostatique, deux protéines exprimées dans les tissus sains et tumoraux de la prostate^{136,137}. L'Ag carcino-embryonnaire (CEA) est souvent fortement exprimé dans le cancer colorectal, mais également dans les cellules épithéliales normales du tractus intestinal¹³⁸.

4.3 Antigènes « cancer/lignée germinale »

L'expression de ces Ag, aussi appelés CTA, est normalement restreinte aux cellules germinales et trophoblastes^{73,139}, cependant ils peuvent être exprimés de manière aberrante dans les tumeurs (Tableau 2).

Tumor histotype	CTA				References
	MAGE-A1	MAGE-A3	NY-ESO-1	SSX-2	
Bladder	43 ^b	57	32–80	44	(Scanlan et al., 2004; Kurashige et al., 2001; van der et al., 2002; Sharma et al., 2006)
Brain	16–40	56	20	6–29	(Liu et al., 2004; Oba-Shinjo et al., 2008; Lee et al., 2008; Sahin et al., 2000; Tureci et al., 1998a)
Breast	6–18	10	10	4	(Mashino et al., 2001; Scanlan et al., 2004; Otte et al., 2001)
Colon	30	20	2–10	12	(Mashino et al., 2001; Mori et al., 1996; Li et al., 2005)
Esophageal	53	75	24–33	0	(Mashino et al., 2001; Scanlan et al., 2004; Weinert et al., 2009; Fujita et al., 2004)
Head and neck	30–40	44–54	7–28	5–35	(Filho et al., 2009; Ries et al., 2009; Kienstra et al., 2003; Cuffel et al., 2010)
Liver	46–80	42	27–44	47	(Chen et al., 1999, 2000, 2001; Liu et al., 1999; Scanlan et al., 2004; Zhao et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Sato et al., 2005)
Lung	36–49	35–60	27	15	(Gure et al., 2005; Scanlan et al., 2000; Melloni et al., 2004)
Melanoma	40–48	57–76	17–42	35	(Scanlan et al., 2004; Sigalotti et al., 2002b; Vaughan et al., 2004; van der et al., 2002; Gaugier et al., 1994; Brasseur et al., 1995; Tureci et al., 1998a)
Myeloma	20–52	52	7–36	12–23	(Andrade et al., 2008; Jungbluth et al., 2005; Pellat-Deceunynck et al., 2000; van et al., 1999; Atanackovic et al., 2009; Atanackovic et al., 2007; Taylor et al., 2005)
Neuroblastoma	66–36	33–49	36	ND ^c	(Grau et al., 2009; Soling et al., 1999)
Ovarian	28–55	37	30	10	(Gillespie et al., 1998; Scanlan et al., 2004; Zhang et al., 2010; Odunsi et al., 2003; Valmori et al., 2006)

a CTA selection is based on their wide characterization and frequency of expression.

b Percent of CTA-positive specimens.

c ND: not determined.

Tableau 2 : Expression de CTA dans les tumeurs de différents types histologiques (Fratta *et al.*, Molecular oncology, 2011)¹⁴⁰.

Ces Ag sont codés par plus de 70 familles de gènes¹⁴¹, dont une partie majeure est présente sur le chromosome X. Les plus étudiés sont les gènes ou familles de gènes ; *MAGE* (comprenant 25 gènes fonctionnels regroupés dans trois régions du chromosome X : *MAGEA*, *MAGEB* et *MAGEC*^{142–144}), *BAGE*¹⁴⁵, *GAGE*^{146,147}, *NYESO1*^{100,148}, *SSX*^{149,150} et *Cycline A*¹⁵¹. Malgré de récents progrès, les fonctions de la plupart de ces protéines restent peu connues¹⁵². Leur expression spécifique à la tumeur résulte de la déméthylation de leur promoteur^{153–156}. Cependant, un faible niveau d'expression de MAGE-A12 a récemment été signalé dans le cerveau humain¹⁵⁷. Certains CTA sont très immunogènes, ils induisent des réponses B et T

chez les patients porteurs de tumeur qui les expriment. Comme les cellules germinales et les cellules trophoblastiques n'expriment pas de molécules du CMH à leur surface¹⁵⁸, elles ne peuvent pas présenter d'Ag aux LT. En raison de l'immunogénicité élevée de ces Ag et de leur expression limitée à la tumeur, ils offrent des possibilités pour le diagnostic et le ciblage thérapeutique du cancer par vaccination ou transfert adoptif de LT.

L'Ag tumoral NY-ESO-1

NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous cell carcinoma-1) ou *CTAG1*, est un CTA qui a été identifié par la technique SEREX¹⁰⁰, il est exprimé par un large éventail de tumeurs malignes telles que le mélanome, le cancer du sein¹⁵⁹, de la vessie, de la prostate, de l'ovaire et le carcinome hépatocellulaire¹⁰⁰. NY-ESO-1 est une protéine de 18 kDa avec 180 acides aminés (AA), comprenant une région N-terminale riche en glycine et une région C-terminale fortement hydrophobe avec un domaine Pcc-1. Les fonctions biologiques de cette protéine sont inconnues. Cependant, le domaine Pcc-1 suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la progression du cycle cellulaire¹⁶⁰. NY-ESO-1 est un Ag tumoral hautement immunogène capable d'induire des réponses spécifiques humorales^{89,159} et cellulaires¹⁶¹. Le transfert adoptif de LT CD8 et CD4 spécifiques de NY-ESO-1 a eu des bénéfices cliniques dans le mélanome et le sarcome^{162,163}. NY-ESO-1 a également été sélectionné pour le développement de vaccins anti-cancer^{164–166}. Actuellement, NY-ESO-1 est une cible privilégiée pour le développement d'immunothérapies et est impliqué dans de nombreux essais cliniques¹⁵².

4.4 Antigènes mutés

Les mutations somatiques ou autres altérations génétiques comme la fusion de gènes, l'épissage alternatif et les insertions ou délétions codent pour de nouvelles séquences peptidiques dans les tumeurs, qui sont absentes des tissus sains. Même s'il existe des mutations récurrentes oncogéniques (driver mutations) dans des oncogènes connus (CDK4, KRAS^{167–169}, protéines de fusion BCR-ABL et TEL-AML1^{106,170}), la plupart des mutations tumorales sont des mutations accessoires (passenger mutations) qui ne confèrent pas d'avantage de survie aux cellules. Les mutations sont donc présentes le plus souvent dans des tumeurs uniques (mutations privées)¹⁷¹. Une médiane de 44

mutations par tumeur a été observée avec un nombre de mutations élevé dans les tumeurs induites par des agents mutagènes comme le mélanome avec les rayons UV et les cancers bronchiques, ORL et de la vessie avec le tabac. La fréquence des mutations somatiques a été répertoriée dans plusieurs cancers¹⁷¹ (Figure 5).

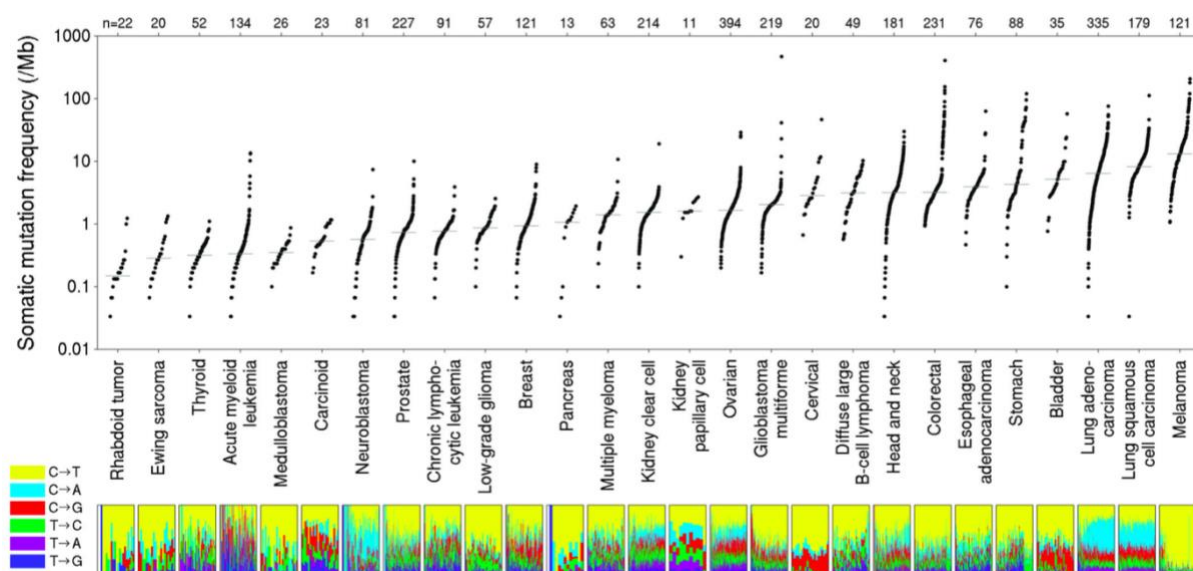


Figure 5 : Fréquence des mutations somatiques dans les cancers (Lawrence *et al.*, Nature, 2013)¹⁷¹.

Certaines séquences mutées peuvent constituer des épitopes, appelés néoépitopes ou néoantigènes, reconnus par les LT CD4 ou CD8^{172,173}. Il est supposé que la contribution de ces Ag à l'immunogénicité des tumeurs varie en fonction du taux de mutation. Ainsi, les tumeurs avec un taux de mutation élevé porteraient davantage d'Ag mutés et seraient plus immunogènes. En effet, il a été montré dans le mélanome qu'une charge mutationnelle élevée est associée à la réponse à l'immunothérapie¹⁷⁴ et à la survie des patients¹⁷⁵. Les thérapies basées sur l'utilisation de néoAg peuvent être divisées en deux grandes classes : les vaccins à base de néoAg qui visent à augmenter le nombre de LT spécifiques *in vivo*, et les thérapies cellulaires, dans lesquelles des LT spécifiques des néoAg sont administrés au patient¹⁷⁶. Le processus actuel d'identification des néoAg débute par la cartographie des aberrations génétiques détectées à l'aide de la comparaison du séquençage de l'exome entier des cellules saines et tumorales. Le séquençage de l'ARN est ensuite utile pour analyser les événements d'épissage alternatifs, déterminer si un gène muté est exprimé dans la tumeur et analyser le niveau d'expression. Après l'identification des néoépitopes candidats, il existe trois options pour prédire leur liaison aux molécules du CMH et leur

immunogénicité : la prédiction *in silico* computationnelle, la spectrométrie de masse et les tests basés sur la présence de LT spécifiques chez le patient¹⁷⁷.

4.5 Antigènes viraux

Les virus sont à l'origine de plusieurs types de cancers dont le carcinome du col de l'utérus, le carcinome oropharyngien, l'hépatocarcinome et certaines leucémies¹⁷⁸. Les protéines virales sont produites dans les cellules tumorales et donnent naissance à des peptides antigéniques qui sont alors strictement associés à la tumeur et qui peuvent être détectés par les LT. Les Ag viraux ont montré leur avantage pour la prévention et le traitement du cancer. Le transfert adoptif de LT spécifiques du virus provenant de donneurs peut reconstituer l'immunité antivirale chez les receveurs et être efficace tant pour prévenir que pour traiter les infections à cytomégalovirus, à virus Epstein-Barr et à adénovirus^{179–181}. Dans le cas des cancers associés au virus HPV, les vaccins prophylactiques sont largement utilisés dans la prévention des cancers du col de l'utérus et bientôt mis en place pour les cancers de l'oropharynx liés au HPV. Les vaccins thérapeutiques contenant des peptides longs du HPV correspondant aux protéines oncogéniques et antigéniques E6 et E7 du HPV16 sont apparus comme une thérapie prometteuse dans certains cancers gynécologiques. En effet, ces peptides se sont avérés capables d'augmenter le nombre et l'activité des LT CD4 et CD8 spécifiques du HPV16^{182,183}.

5. Réponse lymphocytaire T spécifique de la tumeur

5.1 Cellules dendritiques

Les DC sont des CPA professionnelles qui acquièrent et apprêtent des Ag puis présentent des motifs peptidiques aux LT CD4 et CD8 naïfs pour induire des réponses immunitaires spécifiques de l'Ag. Les DC sont constituées de sous-types spécialisés qui diffèrent en terme d'origine, fonction et phénotype. On distingue trois catégories : les conventionnelles (cDC), les plasmacytoïdes (pDC) et les inflammatoires (moDC)¹⁸⁴. Les cDC sont soit résidentes dans les LN, soit migratoires présentes dans les tissus et y jouent un rôle de sentinelles. Les cDC peuvent être séparées en cDC1 (CD141⁺) spécialisées dans la cross-présentation des Ag aux LT CD8 et en cDC2 (CD11c⁺) spécialisées dans la présentation des peptides exogènes aux LT CD4¹⁸⁵. Les DC intra-tumorales spécialisées dans l'activation des CTL sont les cDC1, elles

expriment les marqueurs CD141, CCR7 et CLEC9A. En effet, les cDC1 ont un rôle essentiel dans le trafic d'Ag tumoraux vers les LN, ce qui entraîne une stimulation des CTL et un apport d'Ag aux cDC résidentes. Il a été montré que le niveau d'expression de CCR7 dans les tumeurs corrèle positivement avec la présence de DC CD141⁺ et de TIL et avec la réponse clinique¹⁸⁶. Les pDC présentent la première barrière de protection contre l'expansion virale. Après une infection, elles ont une forte capacité à produire des IFN de type I pour faciliter la réponse antivirale. Les moDC (monocyte-derived Dendritic Cells) n'apparaissent qu'en cas d'infection ou d'inflammation. Elles proviennent de la différenciation de monocytes circulants. Une nouvelle classification détaillée des DC a été générée en utilisant le séquençage d'ARN unicellulaire (single cell (sc) RNA-seq)¹⁸⁷. Elle révèle des nouvelles subdivisions au sein des pDC et cDC2 et identifie les progéniteurs circulants de cDC.

Les DC immatures qui ont une forte capacité de capture des Ag (par phagocytose, endocytose ou micropinocytose) expriment peu les molécules du CMH et de co-stimulation à leur surface. Les DC deviennent matures après détection des signaux de danger^{188–190} tels que, dans le cadre de l'immunité anti-tumorale, des facteurs libérés par les cellules tumorales mourantes (ATP, HMGB1), appelés DAMP (Damage Associated Molecular Pattern), ou par le microbiote intestinal, appelés PAMP (Pathogene Associated Molecular Pattern), ils sont reconnus *via* des récepteurs de l'immunité innée tels que les TLR (Toll-Like Receptor) présents à la surface cellulaire ou endosomale des DC. Les cytokines pro-inflammatoires contribuent également à la maturation des DC. Les DC matures perdent alors leur capacité de phagocytose mais acquièrent une capacité élevée de présentation des Ag car elles expriment fortement les molécules du CMH et de co-stimulation. Les DC matures sont aussi capables de produire des cytokines et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) comme les LN, grâce au récepteur de chimiokines CCR7, pour interagir avec les LT et les activer¹⁹¹.

5.2 Activation des lymphocytes T

1. Apprêtement des Ag et présentation des peptides par les molécules du CMH

Les Ag ne sont pas reconnus sous leur forme native par les LT, des mécanismes protéolytiques faisant intervenir des protéases, permettent leur fragmentation en peptides qui seront présentés par les molécules du CMH.

Le CMH de classe I exprimé par toutes les cellules nucléées, est spécialisé dans la présentation de peptides endogènes. Cependant, les DC sont également capables de présenter des peptides exogènes sur leur CMH-I par le processus de présentation croisée¹⁹² (Figure 6).

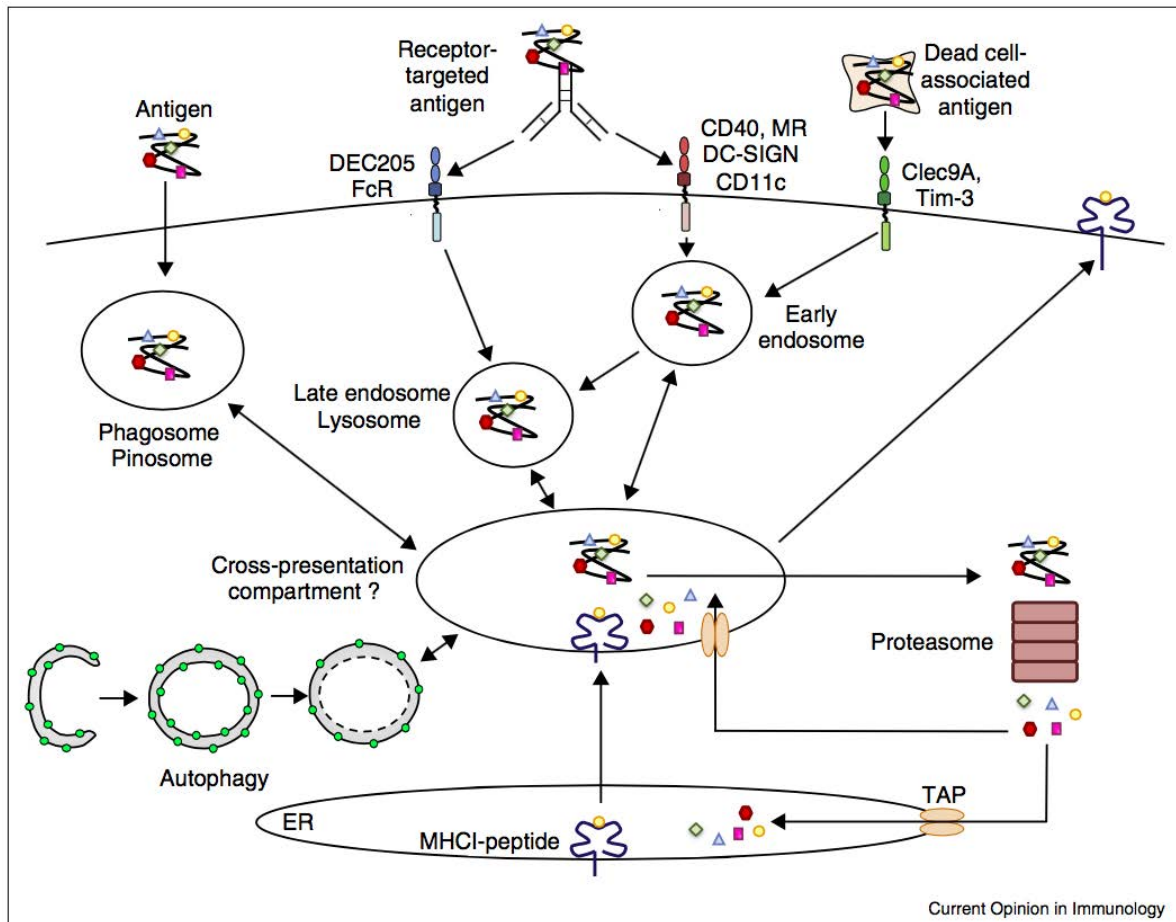


Figure 6 : Présentation croisée (Mintern *et al.*, Current opinion in Immunology, 2015)¹⁹³.

Différents mécanismes permettent aux Ag d'être internalisés dans les DC et d'accéder au CMH-I¹⁹³. Ils peuvent être transférés des vésicules d'internalisation vers le cytosol grâce au système ERAD (ER-Associated Degradation system). Une fois dans le cytosol, les Ag sont dégradés en peptides par un des trois types de protéasome (standard, intermédiaire ou l'immuno-protéasome)^{194,195} et les peptides accèdent au réticulum endoplasmique (RE) ou aux endosomes via le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing). Ils sont alors clivés en peptides de 9 à 11 AA et se lient aux molécules du CMH-I¹⁹⁶. Les complexes CMH-I/peptide sont finalement

exportés à la surface de la DC. Ce complexe CMH-I/peptide est capable de se lier de manière spécifique à un TCR présent sur les LT CD8¹⁹⁷.

Les molécules du CMH-II présentent des peptides originaires de protéines exogènes internalisées¹⁹⁸. Les protéines du soi endogènes peuvent également être apprêtées suite au processus d'autophagie. Les molécules du CMH-II sont transportées de l'appareil de Golgi vers les endosomes et lysosomes sous la forme d'un complexe lié à la chaîne invariante (peptide CLIP). Dans les compartiments endosomaux qui contiennent les Ag internalisés, la chaîne invariante est dégradée et remplacée par des peptides de 13 à 15 AA générés, à partir des Ag, par des protéases vésiculaires à pH acide¹⁹³. Les complexes CMH-II/peptide sont exprimés à la surface des CPA incluant les DC, les LB, les macrophages et les cellules épithéliales thymiques¹⁹⁹, ils se lient spécifiquement au TCR présent sur les LT CD4.

2. Interaction DC/LT

Les DC matures qui présentent des peptides tumoraux à leur surface vont regagner les LN via les vaisseaux lymphatiques pour interagir avec les LT naïfs qui sont attirés par un gradient de chimiokines dans les zones T du paracortex. Pour être amorcés, les LT doivent recevoir trois signaux d'activation qui vont permettre leur expansion clonale et leur différenciation en cellules mémoires ou effectrices²⁰⁰ (Figure 7).

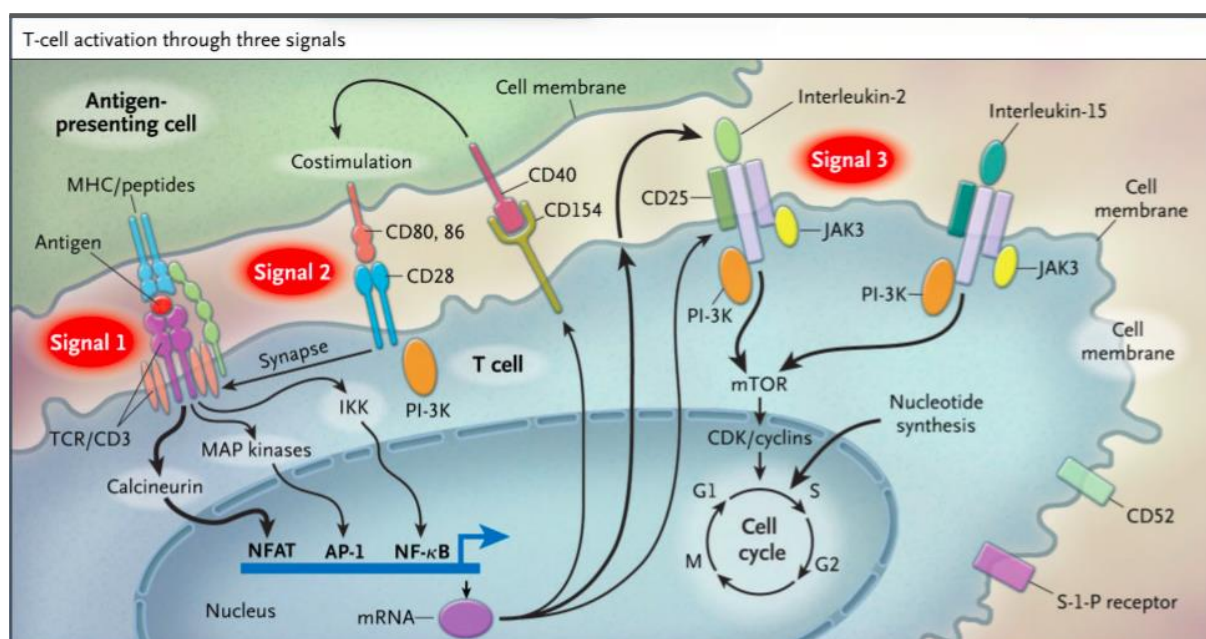


Figure 7 : Les trois signaux d'activation des LT (Halloran, NELM, 2004)²⁰⁰.

Le signal 1 consiste en l'interaction spécifique du TCR (composé de deux chaînes protéiques α et β), avec le complexe CMH/peptide. En parallèle, les corécepteurs tels que CD4 et CD8 interagissent respectivement avec les molécules du CMH-II et du CMH-I. Il doit être suivi par un signal 2, de co-stimulation, qui fait intervenir les molécules CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) exprimées principalement par les CPA et le CD28 exprimé par les LT. L'activation des facteurs de transcription qui en résulte : NFAT (nuclear factor of activated T cells), NF- κ B (nuclear factor- κ B) et AP-1 (activation protein-1), favorise l'expression de nouvelles molécules par le LT incluant le CD154, l'IL-2 (interleukine-2) et le CD25. L'IL-2 et d'autres cytokines (ex. IL-15) qui se fixent sur leurs récepteurs spécifiques, activent la voie Pi3K/mTOR qui initie la prolifération des LT et déclenchent les mécanismes qui amplifient les réponses T. Le signal 3, induit par d'autres cytokines (ex. IL-12 et IFN de type I) permettra également la différenciation des LT naïfs. Dans le cas des LT CD4, le signal 3, qui fait intervenir plusieurs cytokines, est responsable de l'orientation de leur différenciation. Les LT CD4 peuvent en effet être polarisés vers différents sous-types comme les LT auxiliaires (Th) : Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou LT régulateurs (Treg) (détaillés ci-après).

Le contact entre les DC et les LT conduit à la mise en place d'une synapse immunologique monocentrique^{201–203} formée suite à une polarisation du cytosquelette d'actine et des microtubules et à la concentration de molécules de présentation, de co-stimulation et d'adhérence (Figure 8).

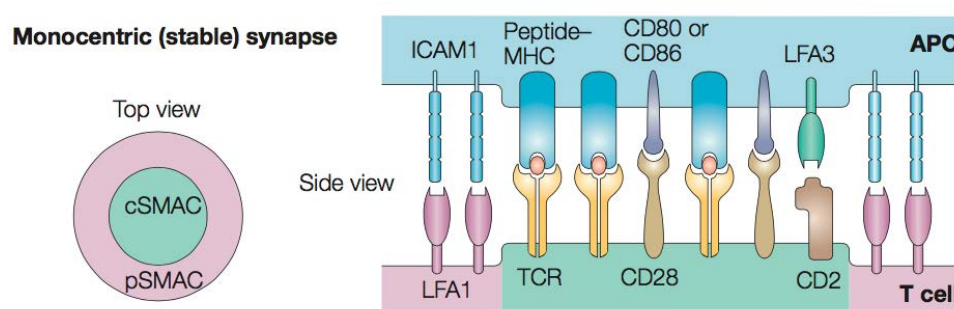


Figure 8 : Synapse immunologique (Friedl *at al.*, Nature review, 2005)²⁰³.

La synapse immunologique est stable et dynamique, elle s'organise en régions concentriques. La partie centrale appelée cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster) comprend principalement le TCR qui interagit avec le complexe CMH/peptide, et les molécules de co-stimulation. A la périphérie, se trouve la région pSMAC

(peripheral Supramolecular Activation Cluster), composée des molécules d'adhésion, notamment ICAM-1 et LFA-1.

5.3 Sous-populations de lymphocytes T CD4

Les LT CD4 sont une famille de lymphocytes très diversifiés qui présentent un certain niveau de plasticité de différenciation^{204,205}. Ces cellules fournissent une aide essentielle aux LT CD8/CTL et LB en remplissent des fonctions effectrices ou régulatrices selon les signaux de l'environnement. Des combinaisons de cytokines permettent aux LT CD4 naïfs de se différencier en sous-populations qui luttent contre l'invasion par des pathogènes intracellulaires (Th1), les agents infectieux extracellulaires, notamment des parasites (Th2), les infections bactériennes extracellulaires et fongiques (Th17) et régulent l'auto-immunité (Treg)²⁰⁶. Dans le cancer, les LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux ont été identifiés, ils peuvent induire, maintenir ou supprimer les réponses immunitaires (Figure 9).

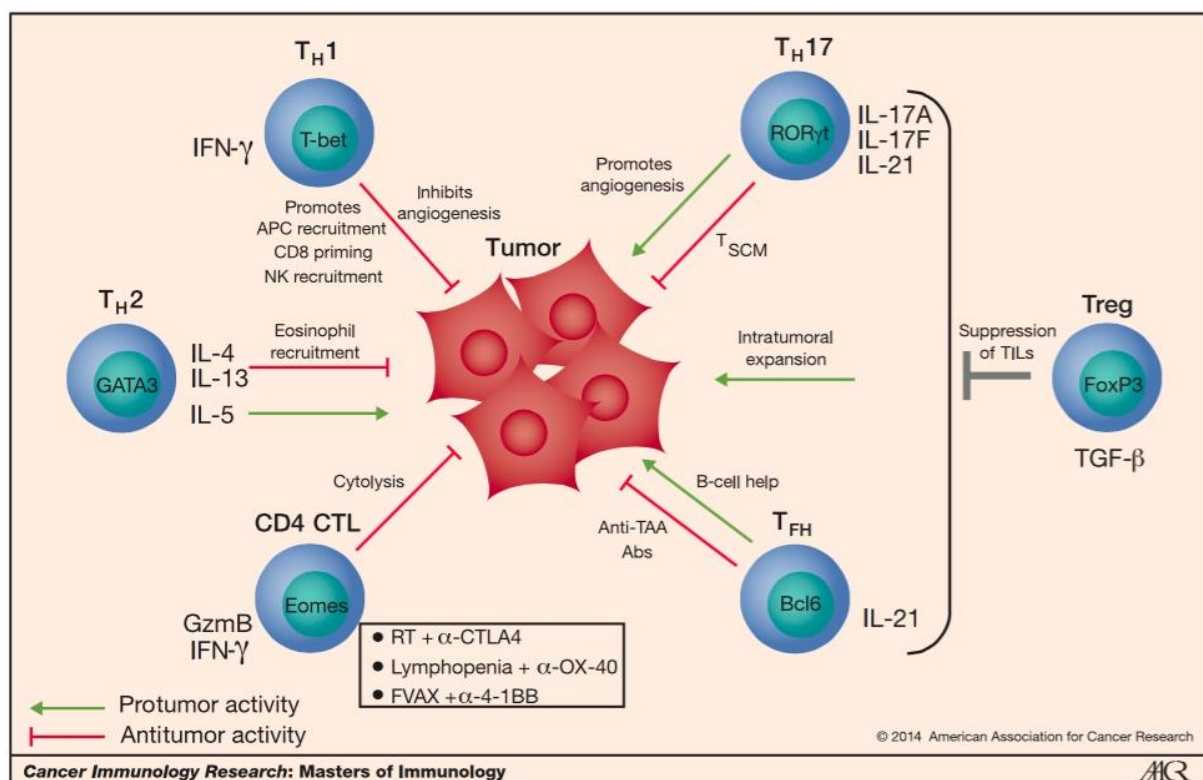


Figure 9 : Contribution des LT CD4 à l'immunité anti-tumorale (Kim et Cantor, Cancer Immunology Research, 2014)²⁰⁷.

Des études ont suggéré que les Th1, LT CD4 cytotoxiques (CD4 CTL) et Tfh peuvent exercer une activité anti-tumorale efficace. D'autre part, les Treg ou, dans certaines circonstances les Th2 et Th17, peuvent avoir une activité pro-tumorale²⁰⁷.

Th1 et Th2

Les fonctions des Th1 et Th2 sont déterminées par respectivement, par les facteurs de transcription T-bet²⁰⁸ et GATA3²⁰⁹. Les cellules Th1 sont caractérisées par la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α , les Th2 sécrètent les IL-4, -5, et -13. Des études ont montré que les lymphocytes Th1 ont une puissante activité anti-tumorale grâce à leur forte production d'IFN- γ et de chimiokines qui améliorent l'amorçage et l'expansion des CTL^{210,211}. Les Th1 aident également à recruter des NK et des macrophages de type I au site tumoral²¹². La contribution des Th2 à l'immunité anti-tumorale a été controversée. L'IL-4 peut exercer des effets antitumoraux²¹³ en facilitant une infiltration accrue des éosinophiles et des macrophages²¹⁴. Le transfert adoptif de Th2 et l'induction d'une immunité Th2 peuvent éliminer des métastases de mélanome dans les tissus pulmonaires de façon dépendante des éosinophiles²¹⁵. Inversement, les Th2 spécifiques des Ag de tumeur pancréatique peuvent favoriser la transformation et la croissance tumorale²¹⁶. De plus, la fréquence de LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux qui produisent de l'IL-5, a été corrélée avec la croissance progressive des carcinomes du rein et mélanomes²¹⁷.

Th17

La différenciation des Th17 est induite par le TGF- β (Transforming Growth Factor β) et l'IL-6 et maintenue par l'IL-23, leurs fonctions dépendent des facteurs de transcription STAT3 et ROR γ t et ils se caractérisent par la production d'IL-17 (A et F)^{218,219}. Bien que les Th17 et l'IL-17A ont été retrouvés dans de nombreuses tumeurs humaines, leur contribution à l'immunité anti-tumorale reste non élucidée^{220–222}. D'une part, l'IL-17A induit l'expression de chimiokines et métalloprotéases qui favorisent les réponses inflammatoires associées à des effets pro-tumoraux. L'expression intra-tumorale de l'IL-17 pourrait favoriser l'angiogenèse et la croissance des tumeurs et inhiber l'infiltration des CTL^{223,224}. D'autre part, les Th17 différenciés *in vitro* et spécifiques des Ag tumoraux possèdent une activité anti-tumorale contre le mélanome B16 murin^{225,226}. Dans cette étude, les Th17 permettent le recrutement de DC ainsi

que l'amorçage des CTL spécifiques des Ag tumoraux. De plus, la plasticité des Th17 pourrait donner un avantage dans l'activité anti-tumorale. Des auteurs ont mis en évidence une signature génique qui les dote d'un phénotype moins différencié qui pourrait contribuer à leur longue durée de vie, leur plasticité et leur capacité à s'auto-renouveler^{227,228}. Les Th17 spécifiques de l'Ag tumoral MAGE-A3 qui apparaissent spontanément chez les patients atteints d'un cancer du poumon peuvent se différencier en cellules effectrices sécrétant de l'IFN- γ ²²⁹.

CD4 CTL

Ces lymphocytes sont caractérisés par leur capacité à sécréter du granzyme B et de la perforine pour lyser les cellules cibles après stimulation via le CMH-II. Ainsi, les CD4 CTL peuvent avoir une activité dans la surveillance immune des CPA. L'une des principales fonctions des CD4 CTL est l'immunité antivirale, mais ils ont également été détectés lors de réponses anti-tumorales²³⁰. En effet, les cellules tumorales, qui n'expriment normalement pas les molécules de CMH-II, peuvent devenir des cibles pour les CD4 CTL. Il a été montré que l'injection d'IFN- γ ou l'irradiation induit l'expression du CMH-II à la surface des cellules épithéliales ou tumorales^{231,232}. Le transfert adoptif de LT CD4 spécifiques d'Ag tumoraux dans des souris dépourvues de LT, suivi d'une irradiation et d'un traitement par des AcM anti-CTLA-4, entraîne la sécrétion d'IFN- γ et de granzyme B et est associé à la régression des tumeurs²³³. Les marqueurs spécifiques des CD4 CTL n'ont pas encore été définis. Cependant, la molécule CRTAM (Class I-restricted T cell-associated molecule) a été identifiée comme marqueur précoce²³⁴. Les CD4 CTL peuvent se développer aux sites d'infection et d'inflammation à partir de Th0, Th1, Th2, Th17 ou Treg²³⁵. Néanmoins, ceux dérivés de Th1 représentent la majorité des CTL CD4, ils produisent de l'IFN- γ seul ou associé au TNF- α et à l'IL-2²³⁶. Dans un modèle murin, des études ont montré que l'activité des molécules de co-stimulation OX-40 et 4-1BB peut également favoriser la formation de CD4 CTL^{237,238}. Les CD4 CTL peuvent être régulés par les facteurs de transcription T-bet et EOMES, en fonction de leur stade de maturation.

LT auxiliaires folliculaires (Tfh)

Leur nom vient de leur capacité à migrer vers les OLS et à résider dans les follicules B où ils interagissent avec les LB pour favoriser leur différenciation en plasmocytes.

Ils sont caractérisés par l'expression de CXCR5, ICOS (Inducible T-cell COStimulator) et PD-1 et par la sécrétion d'IL-21. Leur différenciation est médiée par le facteur de transcription Bcl-6 (B-cell lymphoma 6)²³⁹. Les Tfh sont essentiels pour lutter contre les infections virales et sont impliqués dans l'auto-immunité. Des études ont montré que les Tfh infiltrant la tumeur sécrètent CXCL13 suite à l'activation du facteur de transcription Sox4 et jouent un rôle clé dans la formation de structures lymphoïdes ectopiques, qui sont corrélées avec un bon pronostic^{240,241}. Une analyse récente indique que les Tfh et les LB sont fortement liés à la survie des patients atteints de cancer²⁴².

Treg

Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FOXP3 et la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25). Les Treg peuvent être dérivés du thymus (tTreg) et sont aussi appelés naturels (nTreg), ou être induits (iTreg) en périphérie en réponse au TGF- β ²⁴³. L'activité régulatrice de ces cellules est d'une importance capitale pour le maintien de la tolérance du soi. En effet, elles contribuent à l'inhibition de l'auto-immunité et à la prévention des réponses immunitaires excessives en supprimant la différenciation, la prolifération et les fonctions des LT. Les Treg ont également un impact important sur les réponses immunitaires anti-tumorales, ils empêchent une immunité efficace contre le cancer (les mécanismes régulateurs des Treg sont détaillés dans le chapitre II, partie 3.1). Le rapport Treg/LT CD8 élevé dans les tumeurs corrèle avec une faible survie des patients²⁴⁴. Des facteurs du TME permettent le recrutement des Treg. Dans le cancer de l'ovaire, la chimiokine inflammatoire CCL2 induit la migration des Treg dans la tumeur et est associée à une faible survie²⁴⁵. La sécrétion de la chimiokine CCL21 par les cellules de mélanome favorise l'accumulation de Treg qui est associée à la croissance tumorale²⁴⁶.

Th9 et Th22

Les Th9 ont récemment été identifiés²⁴⁷, ils se différencient sous l'influence du TGF- β et de l'IL-4 et sécrètent de l'IL-9. Ces cellules sont pro-inflammatoires et semblent avoir un rôle important dans les maladies auto-immunes²⁴⁸ et allergiques²⁴⁹. Contrairement aux travaux réalisés sur les cancers hématologiques qui montrent une activité pro-tumorale de l'IL-9²⁵⁰, plusieurs études ont montré que cette cytokine a des propriétés anticancéreuses dans les tumeurs solides. Le transfert adoptif de Th9 spécifiques d'Ag

tumoraux dans des souris déplétées de lymphocytes bloque la croissance du mélanome. Cet effet a été annulé par un traitement avec des AcM neutralisants l'IL-9²⁵¹. Les Th9 induits en présence d'IL-1 β ont montré des fonctions anticancéreuses puissantes d'une manière dépendante de l'IRF1 (Interferon Regulatory Factor 1) et de l'IL-21²⁵².

Les Th22 se différencient en présence d'IL-6 et de TNF- α , ils sont caractérisés par la production d'IL-22 et jouent un rôle dans les maladies inflammatoires et auto-immunes. L'IL-22 a des effets bénéfiques sur la survie et la prolifération des cellules tumorales dans les cancers du poumon, du foie et de la peau non mélanome^{253,254}. Une augmentation de l'expression de l'IL-22 ou de son récepteur est associée à la progression de la maladie et à une diminution de la survie globale dans les cancers du pancréas, gastrique et colorectal^{255,256}. Le potentiel pro-tumoral de l'IL-22 est principalement médié par STAT-3, un oncogène bien établi qui induit l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans les cellules tumorales.

5.4 Mécanisme d'action des CTL

1. Traffic des LT jusqu'au site tumoral et infiltration dans la tumeur

Suite à leur amorçage dans les OLS, les LT expriment le récepteur 1 (S1PR1) de la sphingosine-1-phosphate (S1P) à leur surface et rejoignent la circulation lymphatique en suivant le gradient de S1P²⁵⁷. Les lymphocytes recirculent ensuite en permanence à travers la lymphe, le sang et les tissus lymphoïdes²⁵⁸, ce trafic est essentiel pour la surveillance immunitaire. Les LT vont être attirés jusqu'au site de la tumeur grâce à l'expression de récepteurs de chimiokines (CCR5, CXCR3) qui lient les chimiokines inflammatoires (CCL5, CXCL9, CXCL10) produites au site tumoral²⁵⁹.

Il est bien connu que les lymphocytes naïfs peuvent entrer dans les LN à travers les veinules à endothélium épais (HEV), des vaisseaux sanguins spécialisés dans l'extravasation des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes par une cascade de mécanismes d'adhésion et d'infiltration (rolling, sticking, crawling and transmigration)²⁶⁰. Dans ces étapes, des molécules d'adhésion (LFA1, ICAM1, L-selectin) et de chimiotactisme (CCR7, CCL21) sont impliquées (Figure 10).

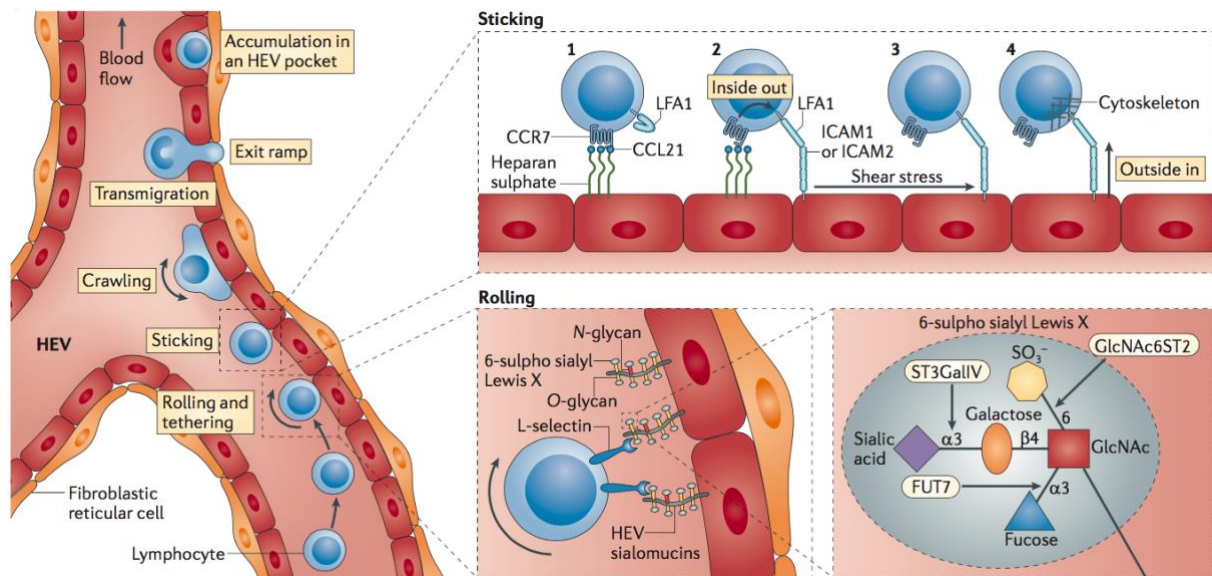


Figure 10 : Entrée des lymphocytes par les HEV (Girard *et al.*, Nature review, 2012)²⁶⁰.

Récemment, il a été démontré que ces vaisseaux HEV, identifiés par leur marqueur MECA-79, sont présents dans les tumeurs solides humaines²⁶¹. Les TIL utiliseraient cette voie pour entrer au site tumoral. En effet, une densité élevée des HEV tumoraux est associée à une infiltration accrue des LB et LT, ainsi qu'à la réponse au traitement dans le cancer du sein²⁶².

2. Reconnaissance des cellules cancéreuses par les LT

Dans les cellules tumorales, certaines protéines présentes dans le cytoplasme et le noyau sont dégradées par le protéasome en peptides. Le transporteur TAP transloque les peptides dans le RE, dans lequel les molécules du CMH-I sont présentes. La liaison de peptides de 9 à 11 AA est nécessaire pour le repliement correct du CMH-I. Le complexe CMH-I/peptide est transporté vers la membrane plasmique, où le peptide est présenté²⁶³. Au site de la tumeur, les LT vont reconnaître le complexe CMH-I/peptide à la surface des cellules cancéreuses, par leur TCR spécifique. Après contact LT/cellule tumorale, une synapse immunologique sécrétoire se forme²⁰³. Similaire à celle créée avec les DC, elle est caractérisée par un domaine sécrétoire, à côté du cSMAC, qui contient des granules cytotoxiques.

3. Lyse de la cellule tumorale

Les LT polarisent rapidement leur centre d'organisation des microtubules (MTOC), le complexe de l'appareil de Golgi, et les granules cytotoxiques, vers la cellule tumorale. Les granules cytotoxiques, contenant de la perforine et des granzymes, sont transportés par des lysosomes sécrétoires²⁶⁴. Ceux-ci fusionnent avec la membrane plasmique des LT au niveau du domaine sécrétoire ce qui permet la libération de leur contenu dans la fente synaptique²⁶⁵. La perforine perce la membrane plasmique de la cellule cancéreuse et permet l'entrée des molécules cytotoxiques capables d'induire l'apoptose de la cellule cible. Après la sécrétion des granules, les protéines localisées dans les lysosomes, telles que les glycoprotéines membranaires associées aux lysosomes (LAMP), LAMP-1 (CD107a) et LAMP-2 (CD107b), sont exprimées à la surface des CTL. Ces molécules sont des marqueurs de la dégranulation. Les CTL expriment le ligand de Fas (Fas-L) également capable d'induire l'apoptose par liaison au Fas présent sur les cellules tumorales, cependant ces cellules cibles ont montré des résistances à ce mécanisme. Les CTL expriment également rapidement des niveaux élevés d'IFN- γ et de TNF- α après leur activation²⁶⁶. Une étude récente montre que l'exposition des cellules tumorales à l'IFN- γ induit des modifications des gènes connus qui déclenchent une interférence avec la prolifération, l'augmentation de la machinerie de présentation des Ag et la libération de chimiokines qui attirent les cellules immunitaires²⁶⁷. L'implication du TNF- α dans le développement du cancer est assez complexe, il a des effets opposés sur la croissance de la tumeur selon ses niveaux élevés ou faibles dans le TME²⁶⁸.

5.5 Aide des lymphocytes T CD4 aux CTL

Les LT CD4 jouent un rôle essentiel dans le développement d'une immunité anti-tumorale efficace²⁶⁹. Ils peuvent avoir des effets anti-tumoraux directs par la sécrétion de cytokines ou en induisant la mort des cellules tumorales *via* les ligands TRAIL ou FasL^{270,271}. Cependant, leur principale contribution est de fournir l'aide nécessaire pour générer et amplifier les réponses CTL spécifiques de la tumeur^{88,272}. Les LT CD4 sont essentiels pour l'amorçage des réponses T CD8 suite à la présentation croisée de l'Ag²⁷³ ainsi que pour leur expansion clonale et leur différenciation en CTL effectrices

et mémoires²⁷⁴. Les DC permettent de relayer les signaux d'aide des LT CD4 vers les CTL.

Amorçage des CTL

L'imagerie intravitale a révélé que l'amorçage des réponses T CD8 se fait en deux étapes et que l'aide des LT CD4 est apportée lors de la deuxième étape (Figure 11)²⁷⁵.

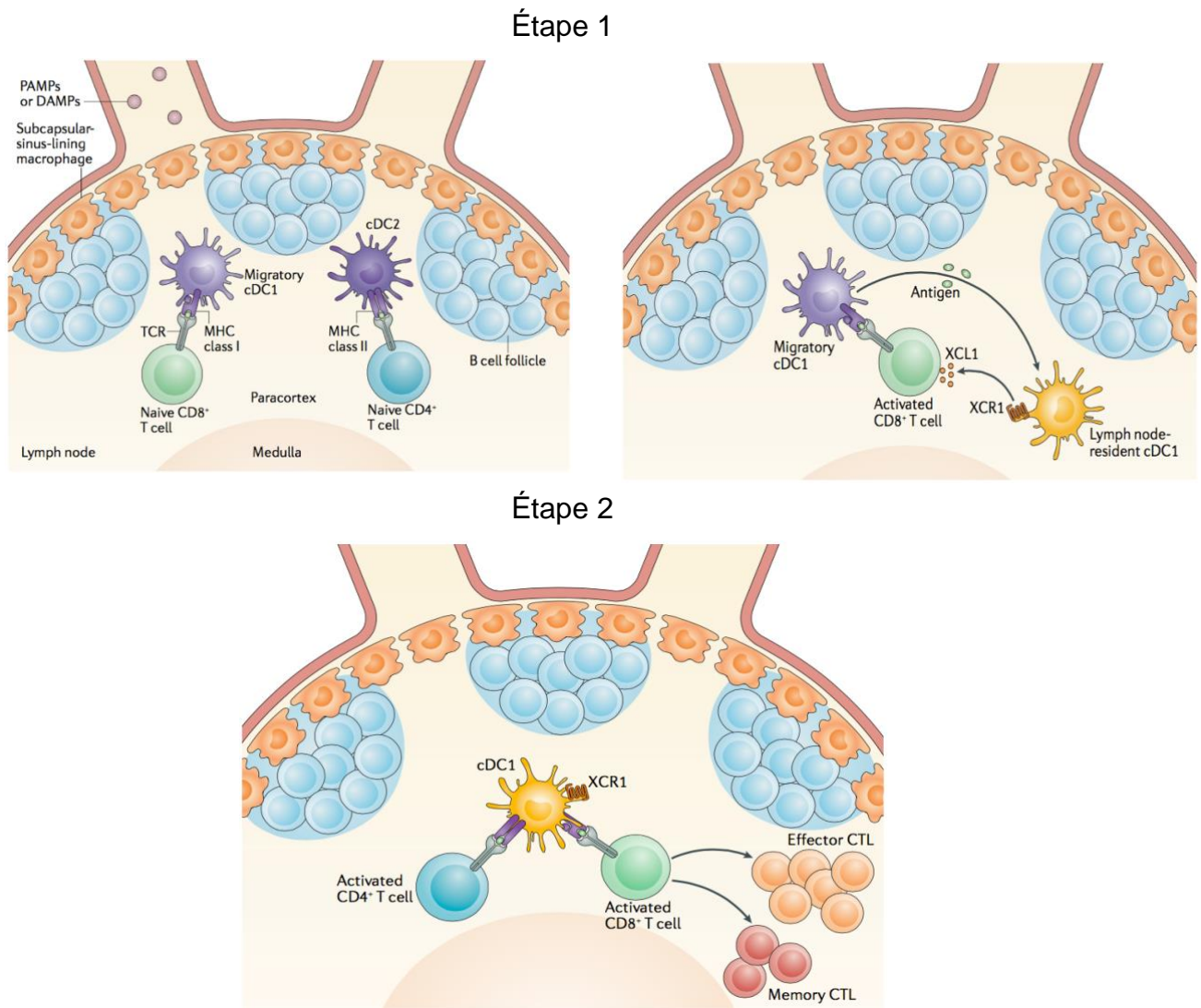


Figure 11 : Amorçage des CTL (Borst et al. Nature review, 2018)⁸⁸.

L'activation des DC migratoires et résidants se fait, dans la première étape d'amorçage, par les signaux innés et, dans la deuxième étape, par les LT CD4^{276,277}. Les LT CD8 et CD4 sont activés dans les LN par différentes populations de DC, souvent de manière asynchrone. Plus particulièrement, les LT CD8 sont initialement

activés par la présentation croisée de l'Ag par les cDC1 migratoires qui ont rejoint les LN. Suite à leur activation, les LT CD8 produisent la chimiokine XCL1 afin de recruter les cDC1 résidants qui expriment le récepteur à l'XCL1 (XCR1) à leur surface²⁷⁸. Ceux-ci vont recevoir l'Ag des cDC1 migratoires qui ont effectué la première étape d'amorçage. Enfin, les cDC1 résidants chargés des Ag tumoraux, migrent vers la zone paracorticale du LN, où ils entrent en interaction avec les LT CD4 préactivés. Cette interaction LT CD4/DC optimise l'activité des cDC1 afin de relayer les signaux qui permettent la différenciation des CTL à partir des LT CD8 préactivés qui reconnaissent l'Ag sur ce même cDC1.

Signaux moléculaires impliqués

Les signaux pour l'expansion clonale et la différenciation des CTL effecteurs et mémoires sont délivrés par le TCR, les récepteurs de co-stimulation et les récepteurs de cytokines. Dans la deuxième étape de l'amorçage, la présentation de l'Ag aux LT CD4 par une cDC1 résidente augmente l'expression du CD40L par ces LT CD4 activés. L'aide est déclenchée par le signal provenant du CD40L qui se lie au CD40 exprimé par la DC. En effet, la stimulation des DC avec des AcM anti-CD40 a supprimé le besoin des LT CD4 pour induire des réponses CTL²⁷⁹. La signalisation CD40 dans la cDC1 augmente sa capacité de présentation de l'Ag, sa sécrétion de cytokines et son expression de molécules de co-stimulation^{275,280,281}. Les interférons de type I, l'IL-12 et l'IL-15 produits par la cDC1 agissent directement sur les LT CD8 pour favoriser leur différenciation en CTL²⁸²⁻²⁸⁴. Les DC stimulés via leur CD40 des niveaux élevés de CD80 et/ou CD86 et CD70, qui interagissent respectivement avec CD28 et CD27 sur les LT CD8. Ces molécules de co-stimulation sont nécessaires puisqu'une combinaison d'AcM bloquants dirigés contre CD80 et/ou CD86 et CD70 a abrogé la capacité des DC activées via leur CD40 à amorcer une réponse CTL²⁸⁵. La signalisation par le TCR et le CD28 initie l'expansion clonale des LT CD8 activés. La signalisation du CD27 active la différenciation, la survie²⁸⁶ et le métabolisme des CTL²⁸⁷, directement ou par l'intermédiaire de l'IL-12 sécrétée par les DC et de l'IL-2 autocrine²⁸⁸ provenant des LT CD8. En effet, le CD27 augmente l'expression du récepteur de l'IL-12 (IL-12R β 2)²⁸⁹ et de l'IL-2 (IL-2R α ou CD25) et la sécrétion d'IL-2 par les LT CD8. L'IL-2 et l'IL-21 sécrétées par les LT CD4 peuvent également soutenir la réponse CTL (Figure 12).

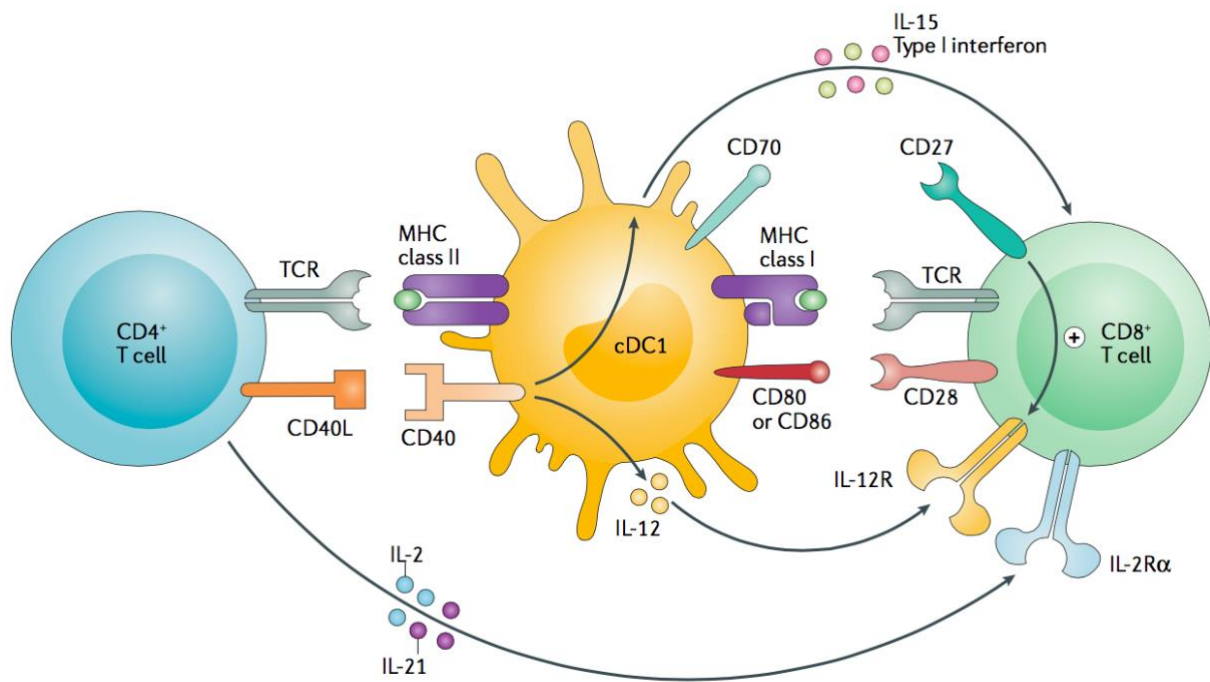


Figure 12 : Interactions moléculaires durant la deuxième étape d'amorçage (Borst et al. Nature review, 2018)⁸⁸.

L'aide des LT CD4 enclenche également des modifications génétiques et épigénétiques des LT CD8 impliquant l'expression de facteurs de transcription²⁹⁰ tels que EOMES, T-bet et ID3, qui optimisent les fonctions effectrices et mémoires des CTL.

5.6 T $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ sont une sous-population de LT qui possèdent un TCR composé par les chaînes γ et δ . Cependant, il est à noter que ces lymphocytes ne font pas partie de la réponse immune adaptative. Ces LT représentent 1 à 5% des LT circulants et contribuent aux réponses immunitaires lors d'infection, de transformation cellulaire et de dommages tissulaires. Ils reconnaissent les Ag par un mécanisme non restreint par le CMH, une caractéristique importante qui les distingue des LT $\alpha\beta$. Les LT $\gamma\delta$ ont un phénotype CD4⁻CD8⁻ et expriment un TCR dont les chaînes variables V δ 1, V δ 2 ou V δ 3 sont couplées avec soit V γ 9 soit V γ 2/3/4/5/8, généralement appelés V γ non9. La plupart des LT $\gamma\delta$ expriment le TCRV γ 9V δ 2 (50 à 95% des LT $\gamma\delta$) et recirculent dans le sang périphérique et les OLS²⁹¹. Les LT $\gamma\delta$ exprimant la chaîne V δ 1, qui est associée aux

différentes chaînes $V\gamma$, sont présents dans les tissus extra-lymphoïdes pour l'immunosurveillance.

Le rôle anti-tumoral des $LT\gamma\delta$ a été identifié et fait intervenir leur sécrétion de cytokines comme l' $IFN-\gamma$ et leur cytotoxicité²⁹². Des analyses transcriptomiques de tumeurs solides ont montré l'association des $TIL\gamma\delta$ totaux avec des résultats favorables dans les cancers²⁹³. Il a été montré que les $TCRV\gamma9V\delta2$ réagissent au phosphoAg²⁹⁴ associé aux complexes $BTN2A1$ et $BTN3A1$ pour tuer les cellules cancéreuses²⁹⁵. Les phosphoAg sont des Ag non peptidiques produits à des niveaux élevés par les voies de biosynthèse des isoprénoïdes dans les cellules transformées ou infectées²⁹⁶. En plus des TCR, les récepteurs de cellules NK, en particulier le $NKG2D$, contribuent également à la réactivité tumorale des $LT V\gamma9V\delta2$ ²⁹⁷. Il a été démontré que la surexpression des ligands de $NKG2D$, $ULBP1$ ²⁹⁸ et $ULBP4$ ²⁹⁹ par respectivement, les tumeurs hématologiques et épithéliales, entraîne des réponses cytotoxiques efficaces par les $LT V\gamma9V\delta2$. En outre, la contribution des $TIL\gamma\delta$ au bénéfice des patients atteints de cancer est controversée^{300,301} et complexe, comme le montre l'association du $TCRV\delta1$ et des $LT CD8$ et non du $TCRV\delta2$ avec la rémission dans le cancer du sein triple négatif³⁰². En effet, les $LT\gamma\delta$ sont très efficaces pour éliminer les cellules tumorales et fournir des réponses protectrices contre le cancer par l'intermédiaire de $IFN-\gamma$, mais dans certains cas, ils peuvent favoriser la croissance de la tumeur par la production d' $IL-17$ ³⁰³. Les immunothérapies à base de $LT\gamma\delta$ sont en développement dans plusieurs essais cliniques³⁰⁴. Le transfert adoptif de LT non $\alpha\beta$ de donneurs sains montre des résultats prometteurs chez les patients atteints de leucémie.

5.7 Mémoire (T_{CM} , T_{EM} , T_{RM})

T_{CM} et T_{EM}

La mémoire immunologique est caractérisée par le potentiel de survie à long terme des LT spécifiques d'un Ag donné. Elle résulte de la différenciation des LT naïfs suite à leur amorçage dans les LN et de l'expansion clonale. Au cours de la ré-exposition à l'Ag, les LT mémoires subissent une forte expansion et provoquent une réponse immunitaire plus efficace et plus rapide par rapport à la réponse primaire. Les travaux de F. Sallusto et A. Lanzavecchia ont permis d'identifier et de caractériser deux sous-populations de LT mémoires; les LT mémoires centraux (T_{CM}) et les LT mémoires

effecteurs (T_{EM}) qui se distinguent par leur phénotype (Figure 13), leur fonction et leur localisation³⁰⁵.

CD4 compartment			CD8 compartment		
T_{CM}	T_{EM}		T_{CM}	T_{EM}	T_{EMRA}
		CCR7			
		CD45RO			
		CD45RA			
		CD62L			
		CD27			
		CD28			
		CXCR5			
		CXCR3			
		CCR4			
		CCR5			
		CRTN2	nd	nd	nd

Figure 13 : Hétérogénéité phénotypique des lymphocytes T mémoires (Sallusto et al. Annual review of immunology, 2004)³⁰⁶.

Les T_{CM} migrent vers les LN grâce à l'expression de CCR7 et CD62L, ils sont dépourvus de fonctions inflammatoires et cytotoxiques. En revanche, ils ont un fort potentiel de prolifération, sécrètent de l'IL-2 et lors d'une seconde stimulation, les LT CD4 mémoires peuvent stimuler efficacement les DC, aider les LB et générer une nouvelle vague de cellules effectrices. Les T_{EM} n'expriment pas CCR7, ils sont facilement disponibles, peuvent pénétrer dans les tissus périphériques inflammés grâce à l'expression de récepteurs de chimiokines et sont dotés de diverses fonctions effectrices. Les LT suivent un modèle de différenciation linéaire dans lequel les LT naïfs se différencient d'abord en T_{CM} puis en T_{EM} . Certains CTL T_{EM} ré-expriment le marqueur CD45RA et sont définis comme T_{EMRA} , ils ont atteint un stade de différenciation plus avancé que les T_{EM} et possèdent la plus grande quantité de perforine. En fonction de l'intensité, de la durée de la stimulation par le TCR et de la présence de cytokines polarisantes, les LT atteignent des niveaux hiérarchiques de différenciation différents³⁰⁷.

T_{RM}

Certains LT mémoires ont récemment été identifiés comme LT résidants mémoires (T_{RM}), ils ont la particularité de persister dans les tissus périphériques sans recirculer³⁰⁸. Les T_{RM} jouent un rôle essentiel dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Il s'agit de LT CD4 ou CD8 hautement activés, même si les LT CD4 T_{RM} sont nettement moins décrits. Un article récent montre que les T_{RM} CD4⁺ jouent un rôle dans des modèles d'inflammation intestinale³⁰⁹. La localisation stratégique des T_{RM} permet une surveillance continue des tissus³¹⁰ et une détection précoce de l'infection. Ils sont capables de produire rapidement et de manière efficace des cytokines inflammatoires (IFN- γ , TNF et IL-2) qui permettent de recruter des DC et T_{EM}³¹¹. Ce sous-ensemble de LT est considéré comme une lignée indépendante avec un profil spécifique de facteurs de transcription, tel que ; Runx3⁺, Notch⁺, Hobit⁺, Blimp1⁺, BATF⁺, AHR⁺, EOMES⁻ et T-bet^{low}³¹².

La résidence des T_{RM} dans les tissus est assurée par deux mécanismes majeurs : l'absence de réponse aux signaux qui favorisent le retour dans le sang ou dans les tissus lymphoïdes et l'adhésion au tissu. La rétention est assurée par trois marqueurs spécifiques des T_{RM} exprimés à leur surface ; l'intégrine CD103 (α_E (CD103) β_7) qui se lie aux cellules épithéliales, l'intégrine CD49a (VLA-1 ou $\alpha_1\beta_1$) qui se lie aux composants de la matrice extracellulaire³¹³ et la lectine de type C CD69 qui régule à la baisse l'expression de S1PR1, récepteur favorisant la sortie des LT des tissus³¹⁴. Il est à noter que certains LT CD8 T_{RM} sont dépourvus de CD103, et que cette intégrine n'est pas un marqueur absolu de la résidence des LT CD4 T_{RM}³¹⁵. Le phénotype des T_{RM} dépend des cytokines et des cellules sécrétrices qui infiltreront les tissus, ce qui peut expliquer leur diversité phénotypique. L'IL-33 et le TNF- α , en combinaison avec le TGF- β , peut induire un phénotype T_{RM}³¹⁶, ainsi qu'une diminution de l'expression du facteur de transcription KLF2 responsable de l'expression de S1PR1 dans les LT CD8³¹⁷. L'IL-15 a été montrée nécessaire pour le maintien du phénotype T_{RM}³¹⁸. Seule une sous-population particulière de DC, les CD1c⁺ qui produisent du TGF- β , ont la capacité de générer des T_{RM}³¹⁹. Ils peuvent être différenciés à partir de LT naïfs dans les LN, en effet, un précurseur de T_{RM} (pT_{RM}) a été identifié³²⁰. Ces pT_{RM} vont être recrutés dans les tissus et maturés en T_{RM} sous l'influence de signaux inflammatoires. Les cellules T_{CM} et T_{EM} peuvent également se différencier en T_{RM} dans les tissus périphériques, ce qui suggère une plasticité des LT mémoires³²¹.

Les T_{RM} ont été identifiés pour la première fois dans des tumeurs de patients atteints de cancer du poumon³²². Dans cette étude, les TIL CD8 CD103⁺, présentent des signatures transcriptomiques et phénotypiques de T_{RM}. Depuis, ils ont été identifiés dans de nombreuses tumeurs solides et semblent jouer un rôle important dans les réponses spécifiques de la tumeur. Dans le cancer du col de l'utérus, CD103 est un marqueur de LT réactifs à la tumeur et de réponse à l'immunothérapie ciblant les protéines E6/E7³²³. Des analyses transcriptomiques ont permis de décrire qu'une signature T_{RM} est fréquemment retrouvée dans les TIL³²². La présence de LT CD8 CD103⁺ dans les tumeurs est corrélée avec une meilleure survie sans récurrence et une meilleure survie globale des patients atteints de cancer du sein, du poumon, de l'endomètre, des ovaires, du col de l'utérus et de la vessie³²⁴. Des études montrent de façon intéressante que les T_{RM} sont corrélés avec la survie de patients atteints d'un cancer du poumon indépendamment des LT CD8^{325,326}. Le CD103 interagit avec la E-cadhérine présente sur les tumeurs épithéliales³²⁷ et cette interaction est nécessaire pour l'exocytose polarisée des granules lytiques (Figure 14).

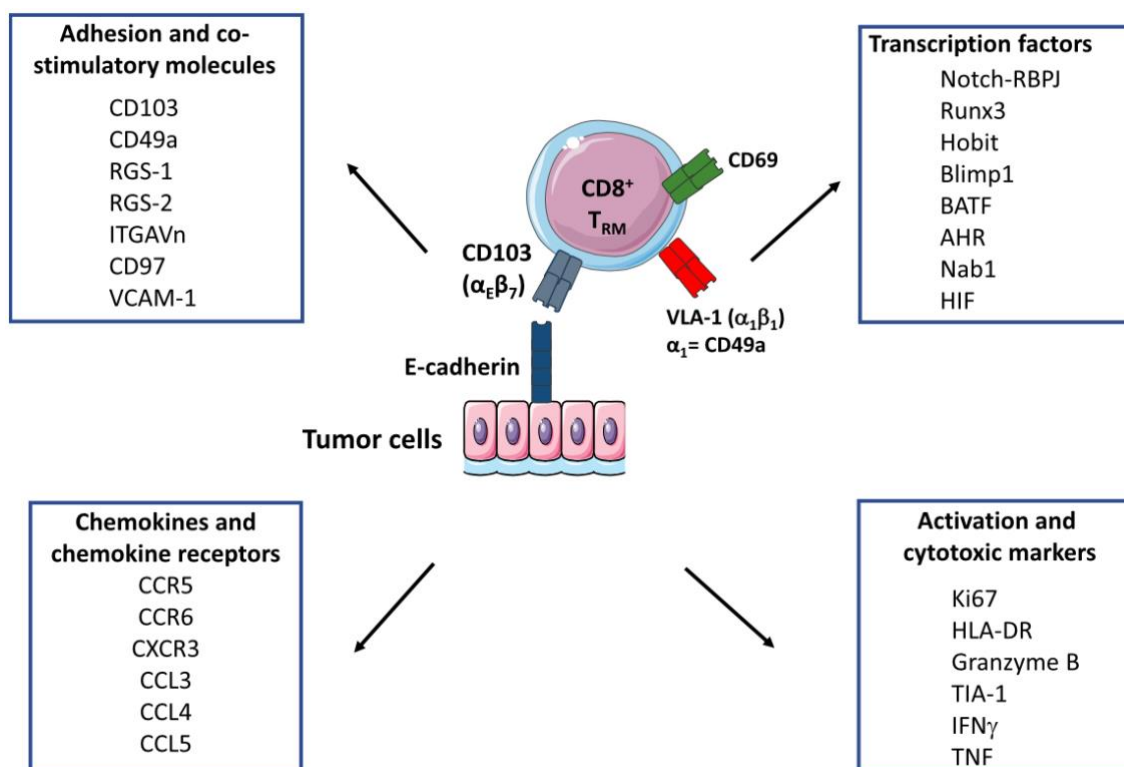


Figure 14 : Signature des T_{RM} (Mami-Chouaib *et al.*, Journal for Immunotherapy of Cancer, 2018)³¹².

Il a été montré que le TGF- β , qui est abondant dans de nombreuses tumeurs solides³²⁸, induit l'expression du CD103 en initiant la signalisation intracellulaire des intégrines via l'activation de la voie PKB/AKT³²⁹. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que le recrutement des LT CD8 dans les tumeurs est inhibé par des AcM dirigés contre le CD103. De plus, la neutralisation par AcM du TGF- β ou l'inactivation de son récepteur sur les LT CD8 entraîne une diminution du nombre de LT CD8 CD103³²⁶. Le transfert adoptif de TIL CD8 présentant un phénotype T_{RM} inhibe la croissance tumorale dans des modèles murins³³⁰. De nouvelles stratégies sont capables d'induire les T_{RM}. Par exemple, la vaccination intranasale induit localement des T_{RM} et inhibe la croissance des tumeurs dans des modèles orthotopiques de cancer de la tête et du cou³²⁶. D'autre part, les T_{RM} participent à l'efficacité d'immunothérapies anti-cancéreuses³²² qui sont détaillées dans le chapitre III. Ainsi, les T_{RM} semblent être des acteurs importants de la surveillance immunitaire des tumeurs³³¹.

II) La tumeur échappe au système immunitaire

Malgré le fort potentiel de reconnaissance et d'élimination de la tumeur par le SI, les tumeurs sont capables de contourner et supprimer efficacement les réponses immunes. En effet, l'échappement au SI est l'un des « hallmarks » du cancer. Le SI crée une pression de sélection des cellules tumorales résistantes à l'élimination par les LT. En parallèle, la tumeur adopte des caractéristiques qui lui permettent d'éviter sa détection, active un ensemble de voies de régulation négative qui perturbent le cycle de l'immunité du cancer et crée un microenvironnement immunosuppresseur. Par conséquent, les LT présents au site tumoral acquièrent des marqueurs à leur surface ainsi que des facteurs de transcription qui régulent négativement leurs fonctions cytotoxiques, leur prolifération et différenciation, ils atteignent un stade d'épuisement.

1. Immunoediting

L'idée que le SI contrôle non seulement la croissance, mais aussi l'immunogénicité des tumeurs^{69,332}, a entraîné une révision majeure du concept de l'immunosurveillance du cancer. Il a été démontré que les tumeurs formées chez les souris ayant un SI incomplet sont plus immunogènes que les tumeurs provenant de souris immunocompétentes. En effet, le SI joue un double rôle dans le cancer. Il peut non seulement contrôler la croissance de la tumeur en éliminant les cellules cancéreuses ou en inhibant leur croissance, mais aussi favoriser la progression de la tumeur, soit en sélectionnant les cellules tumorales qui sont les plus aptes à survivre, soit en établissant un microenvironnement qui facilite la croissance tumorale³³³. Cette observation a permis au groupe de R. Schreiber de formuler la théorie de l'immunoediting du cancer, qui souligne la double action de l'immunité sur les tumeurs en développement. Ce processus se déroule en trois phases distinctes appelées "élimination", "équilibre" et "échappement" (Figure 15)^{334,335}. Il est à noter que les tumeurs peuvent entrer directement dans la phase d'équilibre ou d'échappement sans passer par une phase antérieure.

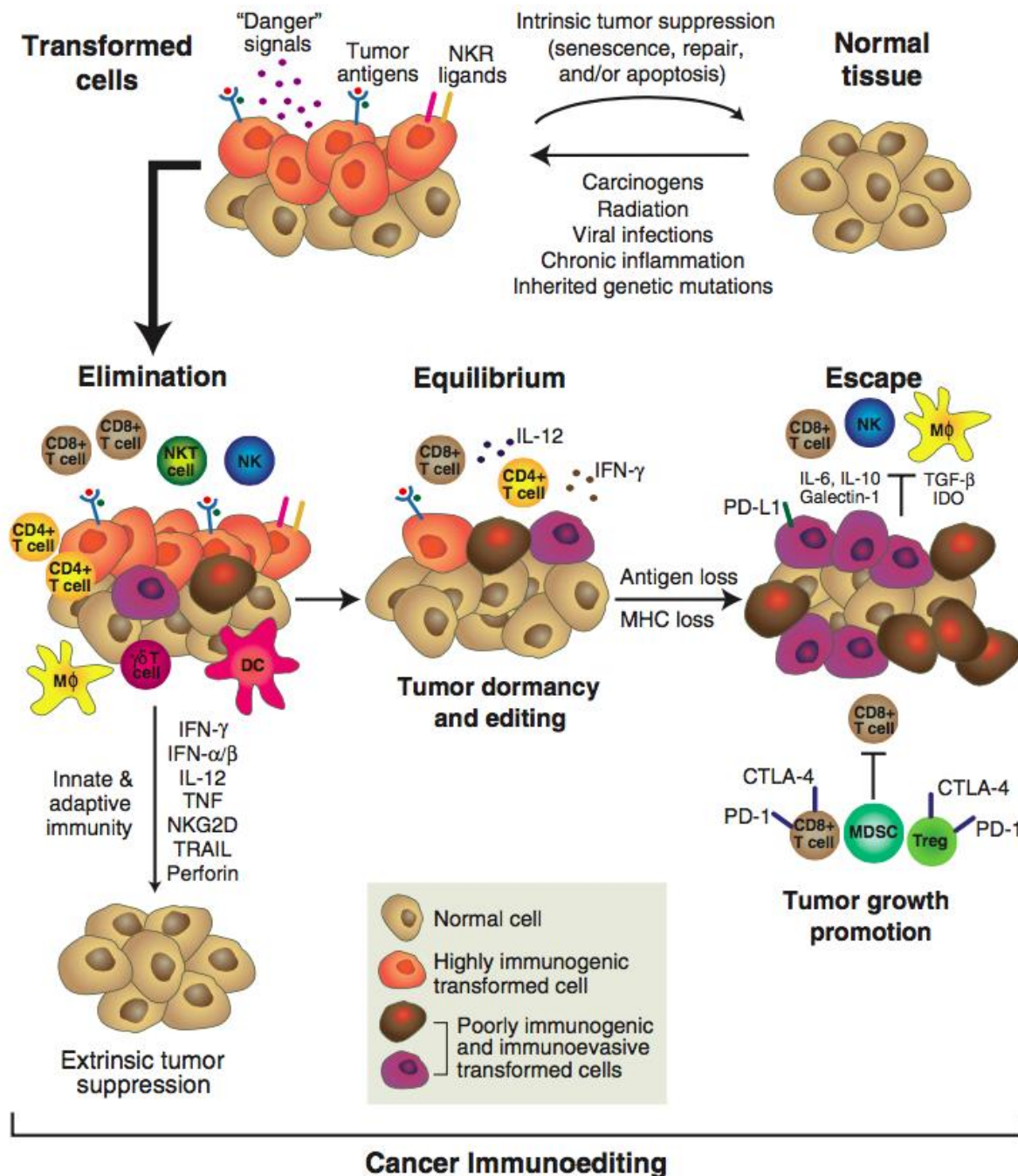


Figure 15 : Le concept d'immunoediting du cancer (Schreiber *et al.* Science 2011).

1.1 Élimination

La phase d'élimination est décrite comme une version actualisée de l'immunosurveillance du cancer, dans laquelle les versants inné et adaptatif du SI travaillent ensemble afin de détecter la présence d'une tumeur en développement et la détruire avant qu'elle ne devienne cliniquement apparente. Les mécanismes impliqués sont décrits dans le chapitre 1. Si la destruction des cellules tumorales est

achevée, la phase d'élimination représente le stade final du processus d'immunosurveillance du cancer. L'existence de la phase d'élimination a été déduite de l'apparition plus précoce ou plus importante de tumeurs chez des souris dépourvues de certains sous-types de cellules immunitaires, de molécules de reconnaissance, de protéines cytotoxiques ou de cytokines³³⁴.

1.2 Équilibre

Certaines cellules tumorales peuvent survivre à la phase d'élimination et entrer dans la phase d'équilibre. Dans cette phase, le SI adaptatif empêche la croissance des cellules tumorales mais façonne également leur immunogénicité. En effet, le SI impose une pression de sélection où les cellules tumorales résistantes seront conservées, ce qui a pour conséquence une diminution de l'immunogénicité de la tumeur. Dans cette phase, le SI maintient les cellules tumorales résiduelles dans un état fonctionnel de dormance. Ces cellules tumorales latentes peuvent résider chez les patients pendant des décennies avant de reprendre finalement leur croissance sous forme de tumeurs primaires ou de métastases³³⁶. Les preuves de l'existence d'une phase d'équilibre proviennent d'expériences de tumorigenèse utilisant des souris immunocompétentes traitées avec de faibles doses d'un carcinogène chimique, le 3'-méthylcholanthrène (MCA). Même si ces souris ne développaient pas de tumeurs, elles hébergeaient tout de même des cellules cancéreuses pendant une longue période. Ce phénomène a été démontré grâce à la déplétion des LT CD4 et CD8 et à la neutralisation de l'IFN- γ , ce qui a engendré l'apparition de sarcome au site d'injection du MCA chez 60% des souris³³⁷.

1.3 Échappement

Dans la phase d'échappement, les cellules tumorales qui ont acquis la capacité de contourner la reconnaissance et/ou la destruction immunitaire émergent comme des tumeurs visibles à croissance progressive. Le passage de l'équilibre à la phase d'échappement peut se produire si la population de cellules tumorales change en réponse au SI et/ou si le SI de l'hôte est modifié vers l'immunosuppression. Les nombreux mécanismes responsables de l'échappement des cellules tumorales au contrôle exercé par le SI sont détaillés dans les parties 3,4,5 et 6 de ce chapitre II.

2. Phénotypes immunitaires du cancer

2.1 Tumeurs chaudes et froides

Les tumeurs ne sont pas toutes infiltrées par les cellules immunitaires. L'analyse histologique de coupes de tumeurs de patients ainsi que leur réponse à l'immunothérapie ont permis de décrire trois profils immunitaires (Figure 16)⁸⁴.

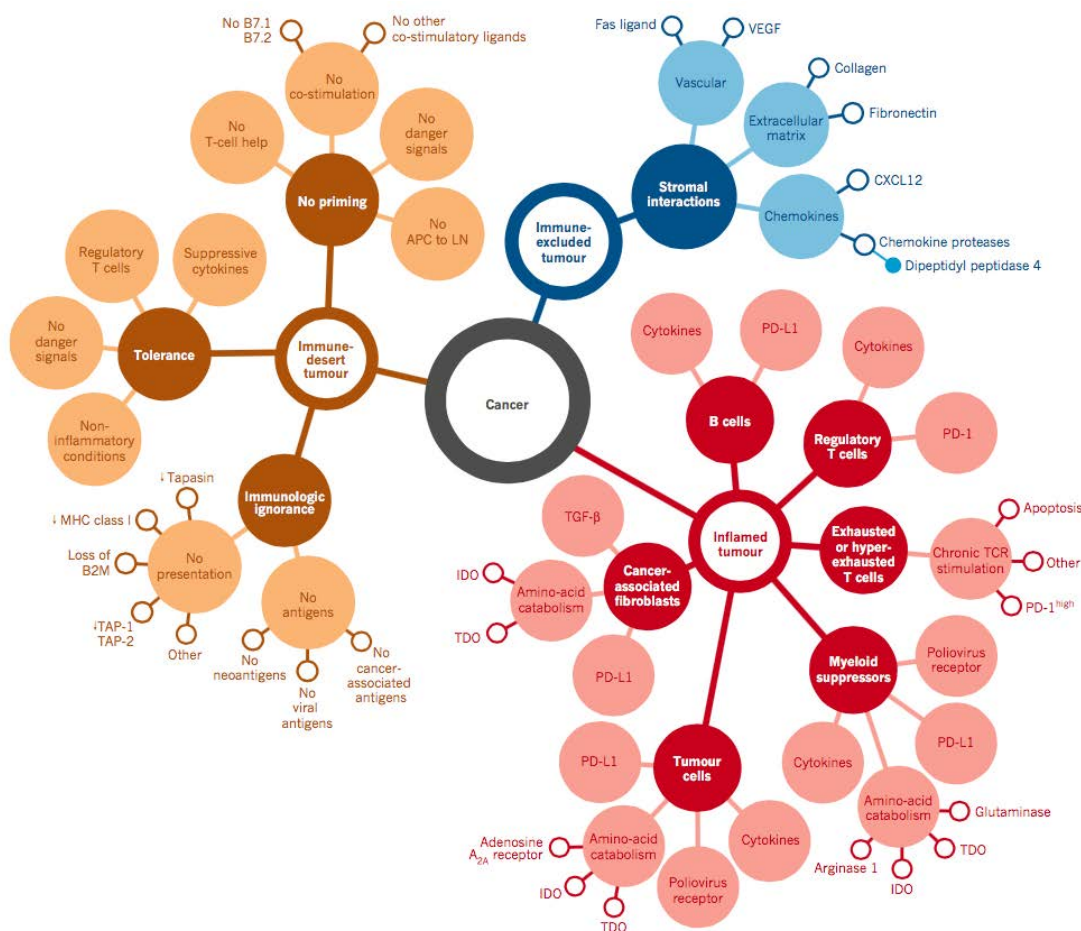


Figure 16 : Phénotypes immunitaires du cancer (Chen et Mellman, Nature review, 2017)⁸⁴.

Le premier profil est le phénotype dit « enflammée », il est caractérisé par la présence de LT CD4 et CD8, souvent accompagnés de cellules myéloïdes, au site de la tumeur. Ces cellules sont positionnées à proximité des cellules tumorales. Les tumeurs enflammées peuvent également être identifiées par marquage immunohistochimique de la molécule PD-L1³³⁸. Cependant, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, par opposition aux cellules immunitaires dans la tumeur, n'est pas toujours corrélée à

la densité de l'infiltrat lymphocytaire³³⁹. Des cytokines pro-inflammatoires et effectrices peuvent également être détectées³⁴⁰. Ce profil suggère que la réponse immunitaire anti-tumorale préexistante a été inhibée. En effet, les réponses cliniques à l'immunothérapie surviennent le plus souvent chez les patients atteints de tumeurs enflammées³⁴¹. Cependant, une réponse n'est pas assurée chez ces individus, ce qui indique que l'infiltration par des cellules immunitaires est nécessaire mais insuffisante. Le deuxième profil est le phénotype immuno-exclue, qui se caractérise également par la présence de cellules immunitaires abondantes. Cependant, les cellules immunitaires ne pénètrent pas dans le tissu tumoral, elles sont retenues dans le stroma qui entoure les cellules cancéreuses^{342,343}. Généralement, après un traitement d'immunothérapie, les LT peuvent présenter des signes d'activation et de prolifération mais pas d'infiltration et les réponses cliniques sont rares. Ces caractéristiques suggèrent que la réponse anti-tumorale est présente mais a été rendue inefficace par un blocage de la pénétration des LT dans la tumeur.

Le troisième profil, le phénotype du désert immunitaire, se caractérise par une pénurie de LT dans le tissu tumoral et le stroma^{344,345}. Bien que des cellules myéloïdes peuvent être présentes, le TME est caractérisé de « non enflammé » avec peu ou pas de LT CD8. Ces tumeurs répondent rarement à l'immunothérapie qui cible les LT³³⁸. Ce phénotype reflète l'absence d'une immunité anti-tumorale préexistante, ce qui peut être le résultat d'une ignorance immunologique, de l'induction d'une tolérance ou d'un manque d'amorçage ou d'activation appropriée des LT.

Plus généralement, les tumeurs enflammées sont dites « chaudes » et les tumeurs immuno-exclues et désertiques sont considérées comme des tumeurs « froides ».

Les cancers des VADS et du col de l'utérus³²³ sont considérés comme des tumeurs chaudes, le cancer de l'ovaire comme peu enflammé. En effet, des TIL ont été détectés chez seulement la moitié des patientes atteintes de cancer de l'ovaire³⁴⁶.

2.2 Éléments qui influencent le profil immunitaire

La mise en place d'un TME enflammé est déterminé par la présence de cellules immunitaires et cytokines (IFN de type I, IL-12, IL-23, TNF- α , IL-2) pro-inflammatoires, favorables à l'activation et l'expansion des LT³⁴⁷. Plusieurs facteurs peuvent influencer la génération d'un tel microenvironnement, comme les variations génétiques et épigénétiques de la tumeur, le génome du patient, l'âge, le microbiome et les facteurs

environnementaux⁸⁴. De faibles variations de ces facteurs suffisent à faire pencher la balance entre tolérance et immunité.

La charge mutationnelle d'une tumeur contribue à son profil immunitaire. Les mutations qui apparaissent au début de l'oncogenèse et qui sont partagées par presque toutes les cellules cancéreuses peuvent générer des réponses anti-tumorales plus efficaces que les mutations qui apparaissent plus tard et qui sont limitées à une sous-population de cellules cancéreuses. Bien qu'une charge mutationnelle élevée favorise les réponses LT, certaines mutations, en particulier les driver mutations, peuvent atténuer les réponses immunitaires. Par exemple, des mutations dans les gènes KRAS et BRAF diminuent l'expression des molécules du CMH-I^{348,349}. Les mutations récurrentes dans les gènes qui contrôlent l'expression des produits du CMH-I ou la mort cellulaire dans les tumeurs, affectent le degré d'inflammation³⁵⁰. Les modifications épigénétiques et l'expression de microARN contribuent également à l'immunogénicité d'une tumeur. En effet, il a été montré que l'expression des cytokines au cours du développement des LT est régulée par des modifications épigénétiques³⁵¹. La réponse aux stimuli infectieux varie d'une personne à l'autre, tout comme la susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes. Ceci est principalement dû à la variabilité des gènes associés à la réponse immune dans la population³⁵². Cette variabilité génétique affecte également la capacité à mettre en place une réponse anti-tumorale. Par exemple, le polymorphisme du gène TLR4 dans le cancer du sein est susceptible d'affecter l'amorçage des LT. En effet, les patients présentant un allèle perte de fonction répondent moins bien à la radiothérapie et à la chimiothérapie, ce qui suggère la présence d'une réponse immunitaire altérée³⁵³. Le microbiome joue un rôle important non seulement dans l'initiation de certains cancers, mais aussi dans la réponse à la chimiothérapie et à l'immunothérapie³⁵⁴. Le microbiote intestinal influence également les réponses anti-tumorales spontanées³⁵⁵. L'immunité anti-tumorale peut aussi être affectée par des facteurs environnementaux comme la présence d'agents infectieux, le régime alimentaire et les médicaments. En plus de ces facteurs, des régulations négatives peuvent interrompre le cycle de l'immunité du cancer à différentes étapes et être responsables de l'absence des cellules immunitaires au site tumoral.

Les tumeurs chaudes et froides sont toutes deux susceptibles d'échapper au SI. Dans le cas des tumeurs froides, il est supposé que les tumeurs ne sont pas, ou peu, immunogènes et que les régulations négatives, conduites par la tumeur, interviennent

plutôt dans les premières étapes du cycle de l'immunité du cancer. Par conséquent, aucune cellule immunitaire n'est retrouvée dans la tumeur. Dans le cas des tumeurs chaudes, l'échappement serait principalement dû à des mécanismes inhibiteurs qui ont lieu au site tumoral et qui ciblent les TIL, ce qui empêche l'élimination des cellules cancéreuses. Les LT atteignent alors un stade d'épuisement.

3. Microenvironnement tumoral immunosuppresseur

Les cellules cancéreuses qui persistent au sein de la tumeur libèrent des molécules inhibitrices et attirent ou induisent des cellules immunes immunosuppressives, ce qui va créer un microenvironnement immunosuppresseur. Celui-ci régule négativement l'activité anti-tumorale des LT jusqu'à atteindre la phase d'échappement (Figure 17).

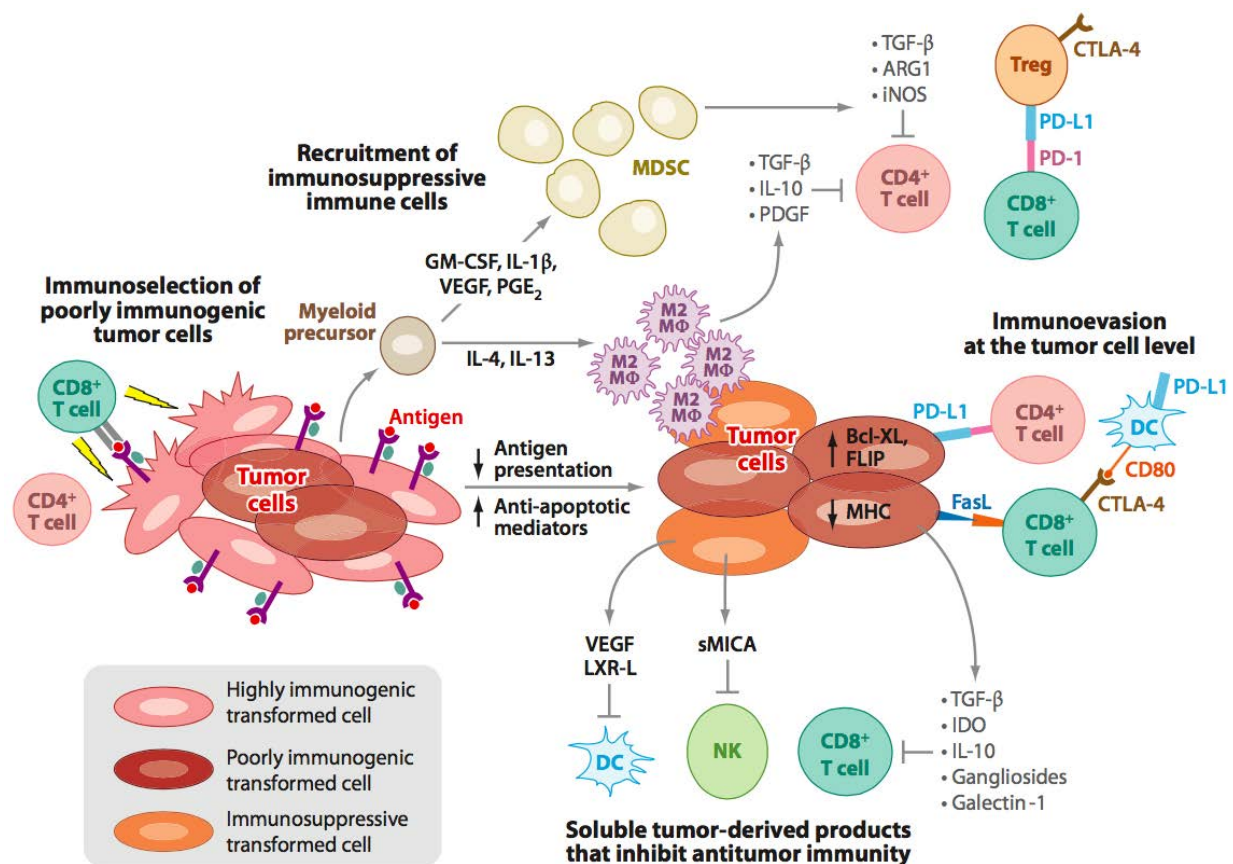


Figure 17 : Mécanismes d'échappement au système immunitaire (Vesely *et al.*, Annual review of immunology, 2011)³³⁴.

3.1 Recrutement et induction de cellules immunes immunosuppressives

Les tumeurs peuvent recruter ou induire des cellules immunitaires immunosuppressives telles que des Treg, MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) et macrophages (M2) qui subissent une expansion locale. L'infiltration par ces cellules est associée à un mauvais pronostic.

Treg

Les Treg s'accumulent au site de la tumeur et exercent des fonctions immunosuppressives. D'un point de vue phénotypique, ils peuvent être identifiés comme LT $CD4^+FOXP3^+CD25^{hi}CD127^-$. Les Treg sont recrutés dans les tumeurs en réponse aux chimiokines sécrétées par les cellules tumorales et les cellules immunitaires innées. Les combinaisons clés de récepteurs de chimiokines et chimiokines sont CCR4-CCL22³⁵⁶, CCR5-CCL5³⁵⁷, CXCR3-CXCL9/10/11³⁵⁸ et CCR10-CCL28³⁵⁹. La déplétion des cellules $CD25^+$ ou $CCR10^+$ a éliminé les Treg des tumeurs qui surexpriment la CCL28 et a inhibé la croissance tumorale³⁶⁰, démontrant l'importance des Treg dans le contrôle de l'immunité anti-tumorale. Dans le cancer de l'ovaire, il a été mis en évidence une accumulation de Treg $CXCR3^+$ qui inhibent la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ des LT³⁵⁸. L'IL-10³⁶¹, le TGF- β ³⁶² et l'adénosine (Ado)³⁶³, dérivés de cellules tumorales et de DC immunosuppressives infiltrant la tumeur, favorisent l'expansion continue des nTreg ainsi que la génération des iTreg³⁶⁴. Dans des modèles murins, des études ont montré que les pDC favorisent l'activation des Treg via l'enzyme indolamine 2, 3-dioxygénase (IDO)³⁶⁵ et que les monocytes ou macrophages qui expriment le récepteur à l'angiopoïétine 2, permettent leur expansion, au dépens de la suppression des LT effecteurs³⁶⁶. Les Treg sont associés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers³⁶⁷. Ils s'accumulent au niveau des lésions primaires³⁶⁸, métastatiques³⁶⁹, ainsi que dans les LN drainants³⁷⁰ la tumeur. Dans les cancers des VADS, ils ont été identifiés avec des fréquences et fonctions suppressives plus élevées dans la circulation sanguine des patients en comparaison aux donneurs sains³⁷¹. Les Treg exercent leurs activités immunosuppressives via de nombreux mécanismes (Figure 18).

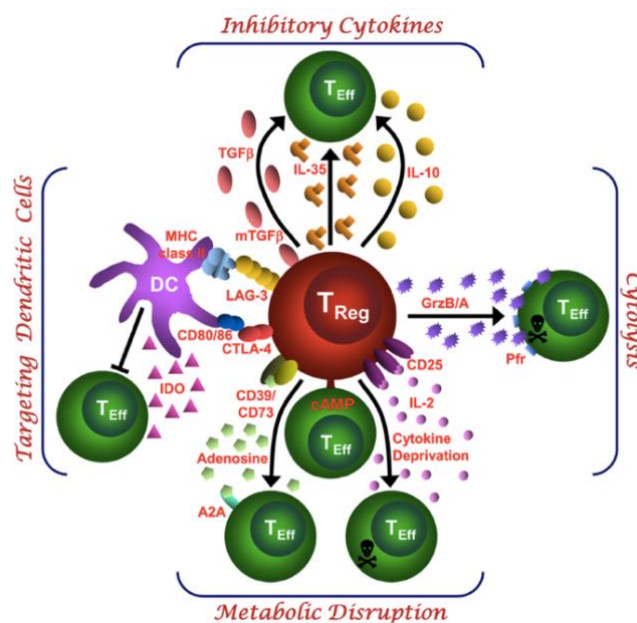


Figure 18 : Mécanismes d'immunosuppression des Treg (Vignali *et al.*, Nature review of immunology, 2008)³⁷².

Perturbation métabolique de l'activité des LT effecteurs. Les Treg ont besoin d'IL-2, sécrété par les LT effecteurs, pour le maintien de leur métabolisme. Cependant, les Treg consomment l'IL-2 de manière abondante via l'expression constitutive de CD25, limitant ainsi l'expansion, la différenciation et la fonction des LT effecteurs qui sont alors privés d'IL-2³⁷³.

Expression de récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, TIGIT qui sont décrits dans la partie 5 de ce chapitre). Les Treg peuvent inhiber la maturation des DC par l'interaction de LAG-3 avec le CMH-II. De plus, les Treg ont une expression constitutive de CTLA-4, qui se lie aux molécules de co-stimulation CD80/86 sur les DC, prive les LT du signal de co-stimulation et induit l'expression d'IDO, d'IL-10 et de TGF-β par les DC³⁷⁴. Les Treg peuvent également interagir directement avec les LT effecteurs, via PD-L1, pour supprimer leurs fonctions.

Génération d'adénosine. L'ATP est une molécule inflammatoire et un signal de danger. Cependant, les Treg, chez la souris, expriment les ectonucléotidases CD39 et CD73 qui, ensemble, convertissent l'ATP en une molécule immunosuppressive ; l'adénosine³⁷⁵.

Sécrétion de cytokines immunosuppressives. Les Treg sécrètent des médiateurs solubles tels que le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-35, qui peuvent supprimer l'expansion des LT effecteurs et la sécrétion de cytokines (IFN- γ , TNF- α)³⁷⁶.

Cytotoxicité directe. Les Treg peuvent également tuer directement les LT ou DC par cytolyse à l'aide du ligand TRAIL³⁷⁷, des granzymes A et B et de la perforine³⁷⁸.

MDSC

Les MDSC représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes progénitrices et immatures³⁷⁹. Elles peuvent se développer dans le sang périphérique grâce à des interactions avec les molécules pro-angiogéniques BV8 (prokineticin-2) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)³⁸⁰ et sont recrutées dans les tumeurs par les chimiokines CCL2 et CXCL5, particulièrement dans les sites d'hypoxie³⁸¹. Les MDSC sont également capables d'inhiber les LT au niveau des LN. La production des molécules GM-CSF, IL-1 β , VEGF, TGF- β et prostaglandine E₂ (PGE₂) par les tumeurs conduit à l'expansion des MDSC et à leur accumulation dans la masse tumorale³⁸². Ces cellules sont considérées comme l'un des composants majeurs de l'immunosuppression dans un contexte tumoral et possèdent de nombreuses fonctions immunosuppressives :

Inhibition des cellules immunitaires effectrices. Les MDSC produisent de l'arginase (ARG), une enzyme qui induit une privation en L-arginine, essentielle pour la prolifération des LT³⁸³. Elles produisent également de l'oxyde nitrique (NO) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui inhibent les TCR et les chimiokines par nitrolyse, empêchant l'activation et l'infiltration intra-tumorale des LT³⁸⁴. De plus, elles sécrètent abondamment les molécules immunosuppressives IL-10 et TGF- β et expriment le ligand PD-L1 ce qui inhibe les fonctions des LT effecteurs.

Induction de l'angiogenèse. Les MDSC sécrètent des facteurs angiogéniques, comme le VEGF, qui favorisent la néovascularisation tumorale.

Stimulation des Treg. Les MDSC expriment le CD40, capable de se lier au CD40L (CD154) exprimé par les Treg, ce qui amène à leur activation³⁸⁵.

Les MDSC circulantes sont associées à une faible survie et sont inversement corrélées avec la présence de LT spécifiques d'Ag tumoraux, par exemple NY-ESO-1³⁸⁶. Il a été montré qu'une réponse clinique à l'immunothérapie, bloquant le récepteur inhibiteur (RI) CTLA-4 exprimé par les LT, ne nécessite pas seulement de réactiver les LT, mais implique également une diminution du nombre de MDSC³⁸⁷. Cependant, les MDSC ont une plasticité phénotypique. Dans un modèle murin, il a été démontré que l'IL-12 différencie les MDSC en cellules capables d'activer et d'améliorer les fonctions effectrices des LT³⁸⁸.

Macrophages M2

Les macrophages favorisent le recrutement et l'activation des LT dans les tissus sains. Cependant, dans le cancer, ils sont associés à la croissance et la propagation des cellules tumorales et leur présence corrèle avec une faible survie dans plusieurs cancers³⁸⁹. Ce rôle paradoxal des macrophages associés aux tumeurs (TAM) s'explique par leur plasticité fonctionnelle. Les signaux environnementaux permettent la polarisation des macrophages M1 associés à des fonctions anti-tumorales, vers un phénotype M2 qui favorise la croissance tumorale³⁹⁰. Les TAM proviennent de monocytes circulants qui sont recrutés dans la tumeur par des signaux du TME, tels que M-CSF, CCL2, VEGF et l'angiopoïétine 2³⁹¹. En présence d'IFN, de lipopolysaccharides (LPS) et d'autres produits microbiens, les monocytes se différencient en macrophages M1. Les macrophages M2, quant à eux, se polarisent en présence d'IL-4 et d'IL-13³⁹². Il a été montré qu'une diminution de l'activation des voies impliquant NF- κ B et mTOR favorise la polarisation M2³⁹³. Les sous-ensembles M1 et M2 diffèrent en termes de phénotype et fonction. Les cellules M1 sont des productrices efficaces de molécules effectrices (ROS, NO) et de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF, IL-6), elles participent aux réponses Th1 dans la réponse aux pathogènes intracellulaires et dans le cancer³⁹⁴. Les cellules M2 participent aux réponses Th2 et sont présentes dans les tumeurs établies, elles favorisent la progression tumorale, la réparation des tissus et l'angiogénèse³⁹⁵. Leur sécrétion de TGF- β , PGE₂ et IL-10 inhibe l'immunité anti-tumorale. De plus, elles présentent une faible capacité à phagocyter les cellules tumorales et à présenter des Ag aux LT³⁸⁹.

3.2 Molécules immunosuppressives

Comme énoncé précédemment, le développement d'un environnement immunosuppresseur est favorisé par des molécules immunosuppressives sécrétées par les cellules tumorales et stromales (fibroblastes associés à la tumeur (CAF), cellules endothéliales, cellules immunitaires immunosuppressives). Ces molécules incluent ; le VEGF, le TGF- β , l'ARG, l'oxyde nitrique synthase (NOS), l'IDO, l'Ado et la PGE₂.

VEGF

En plus de ses propriétés pro-angiogéniques, le VEGF-A produit en grande partie par les cellules endothéliales, induit également un TME immunosuppresseur par divers mécanismes, y compris l'inhibition de la maturation des DC, l'accumulation de MDSC et l'induction de Treg dans des modèles animaux utilisant des lignées de cellules cancéreuses³⁹⁶. Le VEGF interfère avec le développement des LT, au niveau des cellules progénitrices hématopoïétiques, ce qui peut contribuer aux déficiences immunitaires associées aux tumeurs³⁹⁷. Le VEGF-A favorise également la co-expression de plusieurs RI, dont PD-1, CTLA-4, et TIM-3 qui sont impliqués dans l'épuisement des LT, d'une manière dépendante de VEGF-R2 et NFAT³⁹⁸. La neutralisation du VEGF-A, en combinaison avec le blocage de PD-1, favorise la régression tumorale dans des modèles murins de cancer du côlon qui expriment le VEGF. Le double blocage du PD-1/VEGF fait actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques. Cependant, le VEGF-A est exprimé par d'autres cellules présentes dans le TME et peut avoir des propriétés différentes. La délétion du gène *Vegfa* dans des cellules myéloïdes et des fibroblastes a conduit à la croissance tumorale³⁹⁹. L'expression du VEGF-A est induite par le facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia-inductible factors). Une étude récente montre que l'axe HIF-1 α /VEGF-A dans les LT CD8 effecteurs, joue un rôle important dans l'activité anti-tumorale. HIF-1 α , favorise le métabolisme glycolytique, la migration et la fonction effectrice des LT CD8, tandis que le VEGF, contribue à l'infiltration par les LT et à la vascularisation des tumeurs⁴⁰⁰.

TGF- β

Dans les conditions physiologiques, le TGF- β induit une tolérance et supprime l'inflammation. Dans la tumeur, il est produit par les cellules cancéreuses, les Treg, les CAF, les macrophages et les plaquettes et régule la génération et les fonctions effectrices de nombreuses cellules immunitaires. Parmi les trois isoformes de TGF- β , le TGF- β 1 est le plus impactant dans la régulation immunitaire anti-cancéreuse. Le TGF- β est synthétisé sous forme de pro-hormone constitué de la forme active du TGF- β , encerclée par le peptide LAP et formant le complexe latent⁴⁰¹. Après sa sécrétion, la libération du TGF- β actif se fait par divers processus, le mieux étudié implique les intégrines $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$. Les récepteurs du TGF- β , TGFBR1 et TGFBR2, fonctionnent sous forme de complexe. Après liaison du TGF- β , le TGFBR2 phosphoryle et active le TGFBR1, qui phosphoryle ensuite des protéines SMAD qui interagissent alors avec divers facteurs de transcription⁴⁰². Dans les tumeurs à un stade précoce, le TGF- β induit l'apoptose des cellules tumorales et est associé à un pronostic favorable, tandis que dans les tumeurs avancées, il est associé à l'agressivité tumorale et à un mauvais pronostic⁴⁰³. Ceci peut s'expliquer du fait que les cellules tumorales qui acquièrent des résistances au TGF- β sont sélectionnées, survivent et tournent à leur avantage les fonctions du TGF- β qui va alors agir négativement sur les cellules du stroma. En effet, dans le cancer des VADS, les mutations amenant à la perte de fonction du TGFBR2 dans les cellules tumorales sont fréquentes et favorisent l'invasion métastatique. Dans un modèle murin, la délétion du TGFBR2 a entraîné une augmentation du TGF- β 1 et a renforcé son effet sur le stroma de la tumeur⁴⁰⁴. La surexpression du TGF- β par les tumeurs supprime les réponses anti-tumorales par l'intermédiaire de nombreux mécanismes (Figure 19). En effet, le TGF- β peut inhiber la production d'IL-2 et de perforine ainsi que l'activation et l'expansion clonale des CTL^{405,406}. Comme mentionné précédemment, le TGF- β est impliqué dans l'induction de l'expression de CD103³²⁰ et d'un niveau élevé de l'expression de PD-1⁴⁰⁷. Il est également capable d'altérer la différenciation des Th1 et Th2, en inhibant l'expression de leurs facteurs de transcription spécifiques^{408,409} et favorise plutôt la différenciation et la croissance des Treg en induisant l'expression du facteur de transcription FOXP3. Le TGF- β peut aussi favoriser le développement et le maintien des Th17 qui ont démontré leur capacité à supprimer les fonctions effectrices des LT CD8⁴¹⁰.

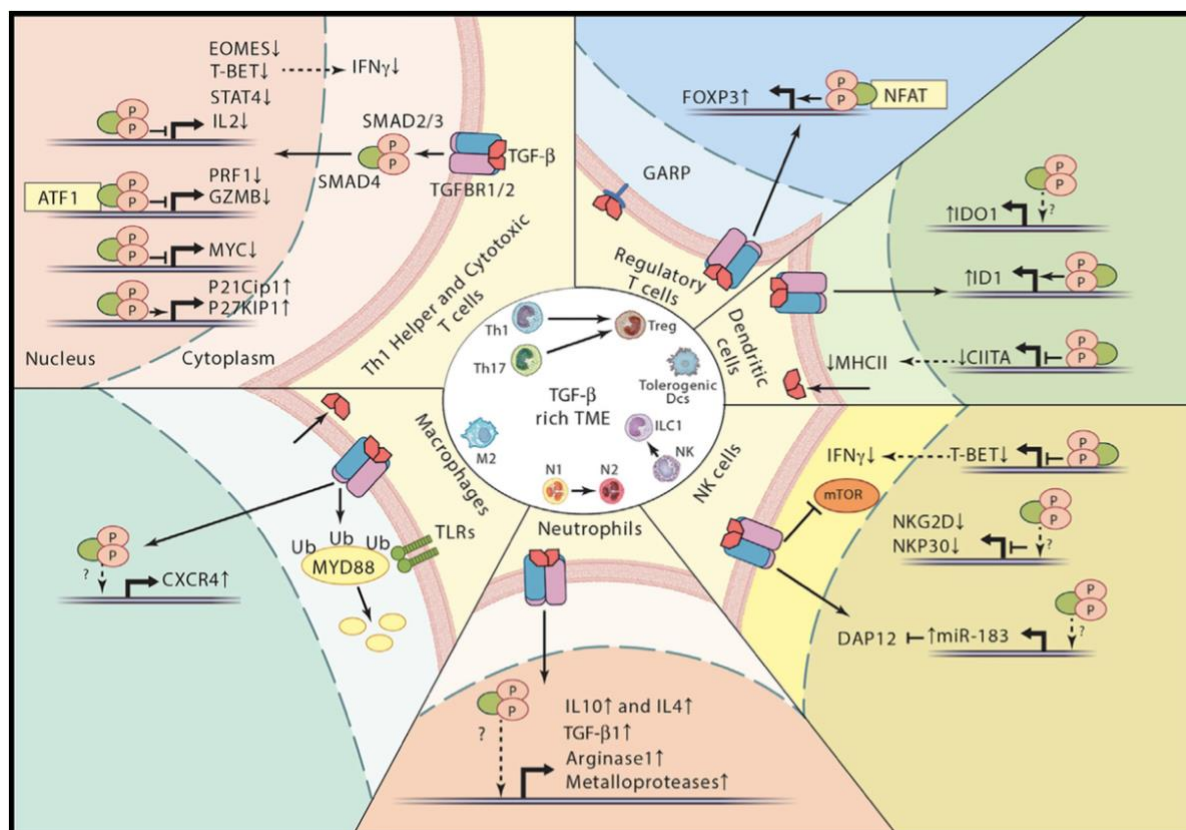


Figure 19 : L'évasion immune médiée par la signalisation du TGF-β dans les tumeurs à un stade avancé (Batlle et Massagué, Immunity review, 2019)⁴¹¹.

En ce qui concerne les cellules du SI inné, le TGF-β inhibe la maturation des DC, atténue leur fonction de présentation d'Ag et modifie l'expression des récepteurs aux chimiokines, ce qui bloque leur migration et réduit la surveillance immunitaire⁴¹². Le TGF-β inhibe directement la production d'IFN-γ par les cellules NK en ciblant la voie mTOR. Il induit aussi la polarisation des macrophages M1 anti-tumoraux vers un phénotype M2 pro-tumoral⁴¹³ et soutient le rôle pro-tumoral des MDSC et neutrophiles. De nombreuses approches précliniques et cliniques ciblant le TGF-β, ses récepteurs ou l'intégrine $\alpha v \beta 8$, sont actuellement menées dans plusieurs cancers⁴¹¹. Notamment, un inhibiteur du TGFB1, en combinaison avec la chimiothérapie ou les AcM contre la molécule inhibitrice PD-1, est en phase I/II d'essais cliniques pour plusieurs types de cancers⁴¹¹.

ARG et NOS

La L-arginine (L-Arg) est un acide aminé semi-essentiel, indispensable pour le métabolisme des LT. L'ARG et la NOS sont deux enzymes impliquées dans le métabolisme de la L-Arg⁴¹⁴. L'ARG, produite par les cellules tumorales et immunes immunosuppressives, hydrolyse la L-Arg en urée et en L-ornithine, cette dernière étant un précurseur des polyamines. La NOS convertit la L-Arg en citruline et en NO, qui sont importants pour l'homéostasie vasculaire et les fonctions cytotoxiques des macrophages⁴¹⁵. Par conséquent, des niveaux élevés d'ARG et de NOS appauvrissent le microenvironnement en L-Arg.

Il existe deux isoformes de l'ARG, l'ARG I et II, qui diffèrent dans la distribution tissulaire, la localisation intracellulaire et dans leur régulation⁴¹⁶. La surexpression des ARG I/II est corrélée avec une maladie plus avancée et un pronostic clinique défavorable dans plusieurs cancers dont les cancers de l'ovaire et des VADS⁴¹⁷. L'inhibition de l'ARG I, exprimée par les cellules myéloïdes associées aux tumeurs, ralentit la croissance tumorale, ce qui suggère un rôle de l'ARG I dans l'échappement de la tumeur au SI⁴¹⁸. En effet, il a été démontré que la consommation de la L-Arg par l'ARG entraîne une régulation négative des fonctions des LT (Figure 20). L'ARG exprimée par les granulocytes inhibe la prolifération, la sécrétion de cytokines et l'expression de la chaîne CD3 ζ du complexe TCR des LT sans toutefois modifier leur viabilité⁴¹⁹. L'ARG altère également la formation de la synapse immunologique et le cycle cellulaire des LT. De plus la L-ornithine, synthétisée par l'ARG à partir de L-Arg, est connue comme promoteur de tumeur⁴²⁰. L'ARG est également associée aux mécanismes de suppression des MDSC et TAM. Des inhibiteurs d'ARG ont été testés en clinique et sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie, de diminuer les complications infectieuses et d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de cancer.

Dans de nombreuses tumeurs, l'expression de l'isoforme inductible de NOS (iNOS) est élevée. Cependant, son rôle et celui du NO synthétisé au cours du développement de la tumeur est très complexe. Des actions pro-tumorales comme l'inhibition de la prolifération des LT et anti-tumorales comme l'induction de l'apoptose des cellules tumorales, ont été décrites⁴²¹.

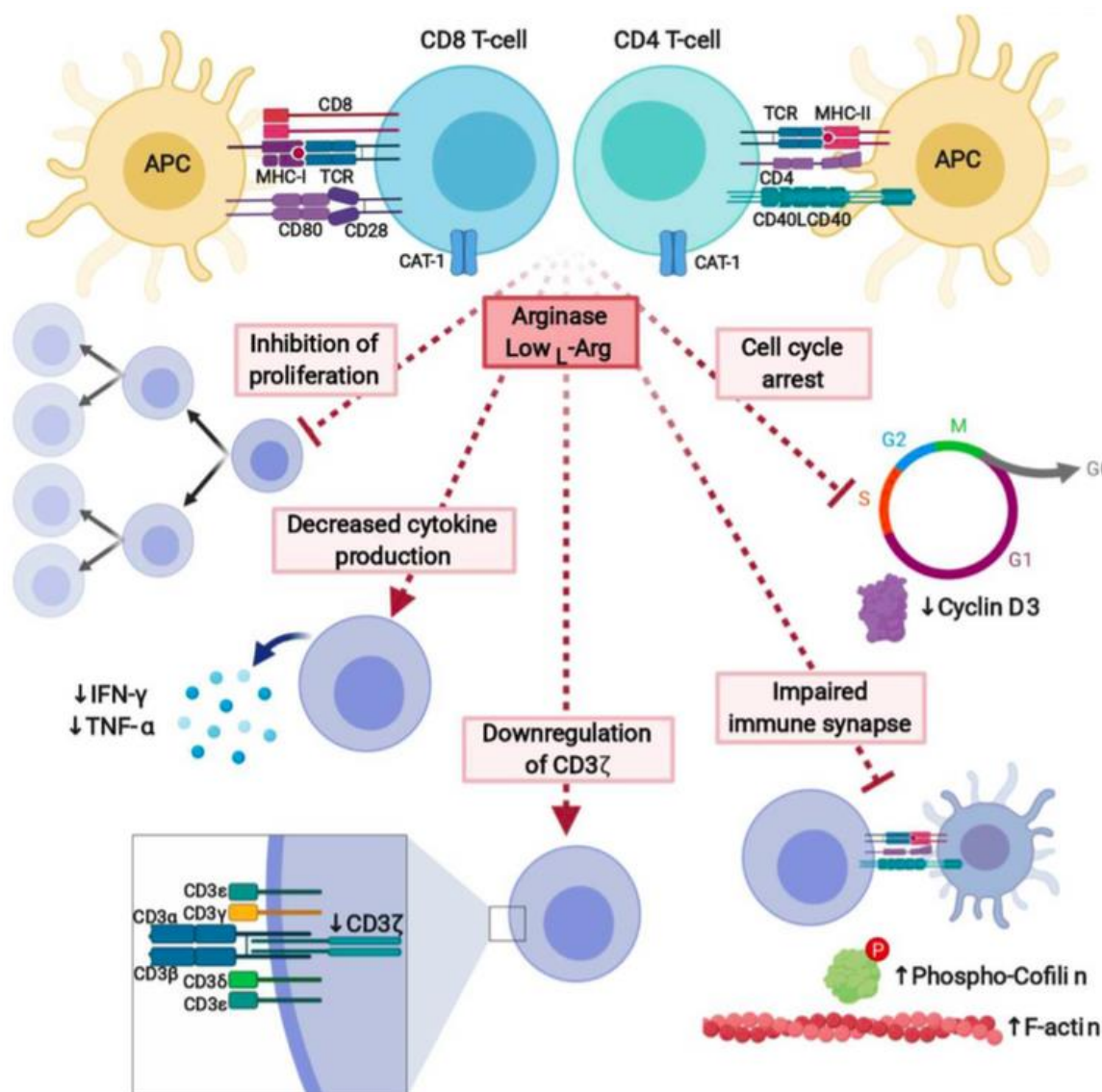


Figure 20 : La déplétion en L-Arg par l'ARG inhibe la réponse immunitaire. (Grzywa *et al.*, *Frontiers in Immunology*, 2020)⁴¹⁷.

IDO

L'IDO est une enzyme surexprimée par les cellules tumorales et les CPA. Elle est chroniquement activée et est associée à un mauvais pronostic clinique dans de nombreux cancers dont le carcinome ovarien⁴²². L'expression d'IDO peut être induite par le signal de danger ; LPS, l'IFN- γ et la molécule d'activation présente à la surface des LT ; CD137. L'IDO inhibe l'activation des LT par la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel et favorise la différenciation et l'activation des Treg par la production de kynurénine⁴²³. L'IDO exerce ses effets immunosuppresseurs au site tumoral et dans les LN drainants. En effet, dans les LN, les DC produisent de l'IDO qui peut directement inhiber les LT spécifiques des Ag tumoraux. L'engagement des

molécules de co-stimulation CD80/86, qui se lient au CTLA-4 exprimé par les Treg, peut également favoriser l'expression d'IDO par les DC. Celle-ci, de manière réciproque, va alors activer les Treg et entraîner la différenciation de nouveaux Treg à partir de LT CD4 non suppressifs. Ces mécanismes sont également favorisés au site de la tumeur par l'IDO produite par les cellules tumorales en réponse aux signaux inflammatoires générés par les LT effecteurs. Les Treg nouvellement différenciés peuvent alors contribuer davantage au microenvironnement suppressif. L'inhibition de l'IDO pourrait renforcer l'efficacité de diverses stratégies immunothérapeutiques et chimiothérapeutiques pour le traitement des patients atteints de cancer. Cette enzyme est impliquée dans la résistance à l'immunothérapie par blocage des RI CTLA-4 et PD-1 présents sur les LT⁴²⁴. La combinaison de cette immunothérapie avec un inhibiteur d'IDO diminue la croissance tumorale et permet d'augmenter la survie dans des modèles animaux⁴²⁵. L'efficacité clinique du double blocage IDO/PD-1 a été récemment évaluée dans un essai de phase I/II utilisant de l'Epacadostat, un inhibiteur d'IDO, en association avec le Pembrolizumab (AcM anti-PD-1).

Ado

L'activité séquentielle des ectonucléotidases CD39 et CD73, exprimées par les cellules cancéreuses, les cellules immunitaires et le système vasculaire, permet l'hydrolyse de l'ATP immunogène en Ado immunosuppressive⁴²⁶. L'hypoxie semble être le principal facteur d'accumulation de l'Ado. L'ATP et l'Ado activent respectivement les récepteurs purinergiques de type 2 (P2) et de type 1 (P1), déclenchant ainsi la signalisation dite purinergique responsable de la modulation du comportement des cellules du TME. Une fois dans le milieu extracellulaire, l'Ado peut exercer un effet local via les récepteurs P1, être métabolisée en inosine ou capturée par les cellules par des transporteurs de nucléosides⁴²⁷ (Figure 21). Les cellules immunitaires innées et adaptatives peuvent exprimer quatre sous-types du récepteur P1, à savoir A1, A2A, A2B et A3⁴²⁸. A1 et A3 sont des récepteurs couplés à la protéine Gi et inhibent l'adénylate cyclase et la production d'AMPc, tandis que A2A et A2B sont des récepteurs couplés à la protéine Gs et stimulent la synthèse d'AMPc et les voies de signalisation en aval⁴²⁹. L'accumulation d'AMPc peut activer les voies de la PKA et de l'EPAC⁴³⁰. Contrairement au récepteur A2A, le récepteur A2B peut également se coupler aux protéines Gq et déclencher la voie de la phospholipase C. Il a en outre été démontré que les quatre récepteurs de l'Ado activent les voies MAPK et ERK⁴³¹.

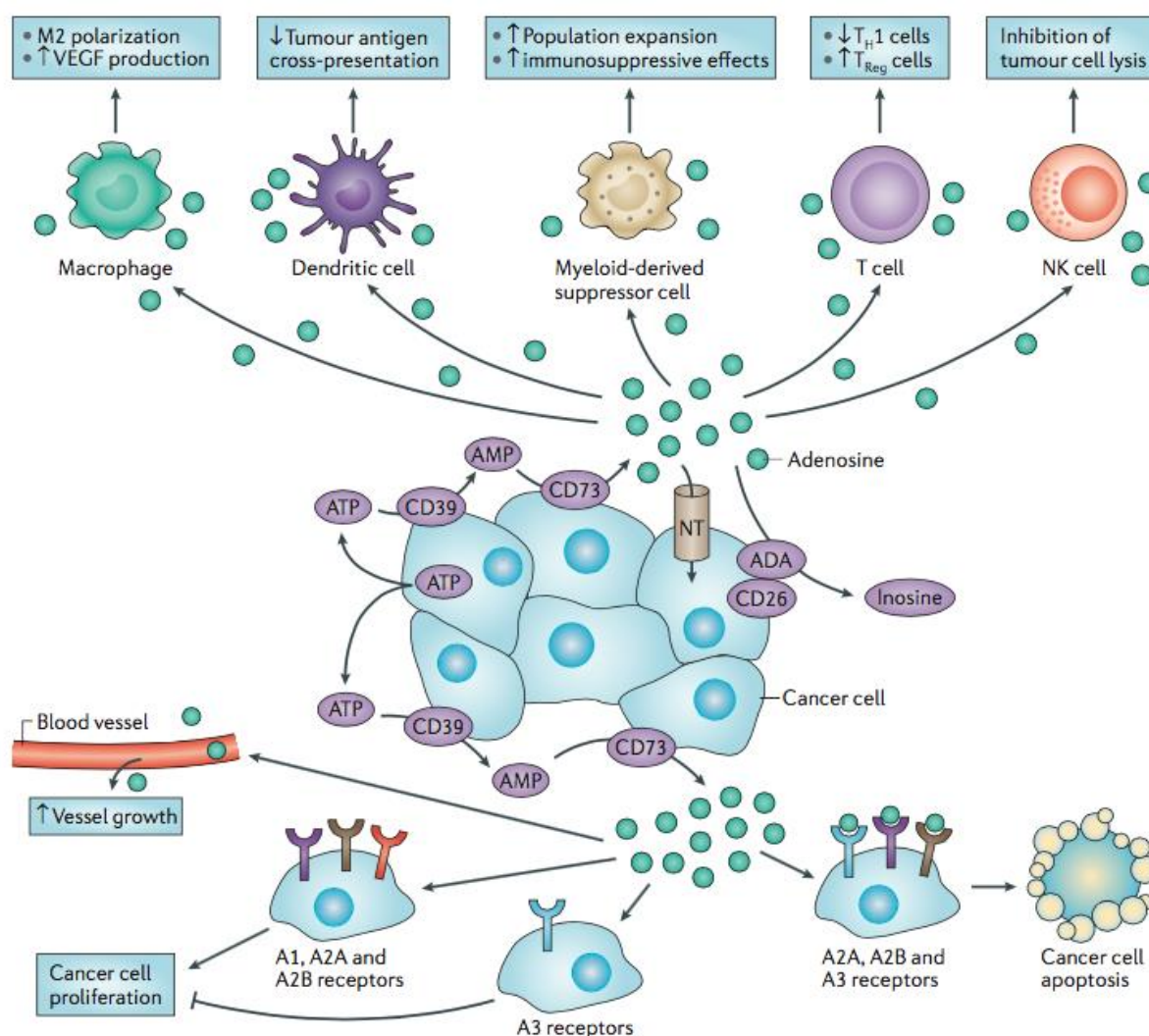


Figure 21 : La voie de l'Ado dans le microenvironnement de la tumeur. (Antonioli et al., Nature Review Cancer, 2013)⁴²⁶.

En général, l'effet immunosuppresseur de l'Ado dans la tumeur est initié via les récepteurs A2A et A2B⁴³². L'activation de ces récepteurs dans les conditions physiologiques protège les tissus contre une réaction immunitaire excessive. La stimulation du récepteur A2A est liée à l'inhibition ; de l'activation des DC, de la production de cytokines Th1 et Th2 et de la maturation et de la cytotoxicité des NK⁴²⁶. La stimulation du récepteur A2A sur les LT effecteurs supprime leur activation et prolifération³⁶³ via l'inhibition de la signalisation du TCR qui entraîne une diminution de la production d'IL-2 et de l'expression de CD25, induit leur anergie et augmente l'expression des points de contrôle de l'immunité CTLA-4 et PD-1⁴³³. De plus, l'A2A active les fonctions suppressives des Treg, des MDSC et des macrophages⁴³⁴. L'activation du récepteur A2B stimule la prolifération et la différenciation des Treg à

partir des LT naïfs, la production d'IL-10 et la fonction des MDSC. L'engagement des récepteurs A2A et A2B inhibe également l'activation des neutrophiles et l'adhésion des cellules immunitaires aux cellules endothéliales⁴²⁹. Du côté de la tumeur, l'Ado a un double effet, elle peut soit stimuler soit inhiber sa croissance, en fonction du type de cellule et du récepteur exprimé par la masse tumorale⁴³⁵.

Les blocages de CD39, CD73 ou du récepteur A2A ont été testés seuls ou en combinaison dans des modèles précliniques et ont permis de diminuer la croissance tumorale et les métastases et de stimuler l'immunité anti-tumorale. Des essais cliniques de phase I combinant le blocage de CD73 ou du récepteur A2A avec des AcM bloquant les points de contrôle immunitaire (PCI) sont actuellement en cours⁴²⁹.

PGE₂

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes qui convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), elle-même précurseur des prostanoïdes, dont PGE₂, qui a un rôle prédominant dans la croissance tumorale. La COX-1 est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus et est impliquée dans plusieurs mécanismes permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire. La COX-2 est induite par de multiples facteurs pro-inflammatoires et est impliquée dans l'inflammation et les cancers. En effet, COX-2 est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs et son expression est associée à l'invasion tumorale et à un pronostic défavorable⁴³⁶. De manière intéressante, des études ont montré qu'une inhibition prolongée de la COX-2 par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pourrait offrir une certaine protection contre le cancer du côlon et d'autres tumeurs malignes⁴³⁷. L'inhibition de COX-2, en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie, a démontré son efficacité dans des modèles précliniques⁴³⁶.

Il a été démontré que la PGE₂ contribue fortement à l'immunosuppression des tumeurs en agissant sur les Th1, les CTL, les NK, les Treg, les DC et les MDSC (Figure 22)⁴³⁸. En effet, la PGE₂ bloque la production de cytokines Th1 alors qu'elle augmente celles produites par les Th2⁴³⁹. Elle inhibe la prolifération et les fonctions des CTL⁴⁴⁰, supprime l'activité anti-tumorale des NK et stimule l'expansion des Treg⁴⁴¹ et des MDSC⁴⁴².

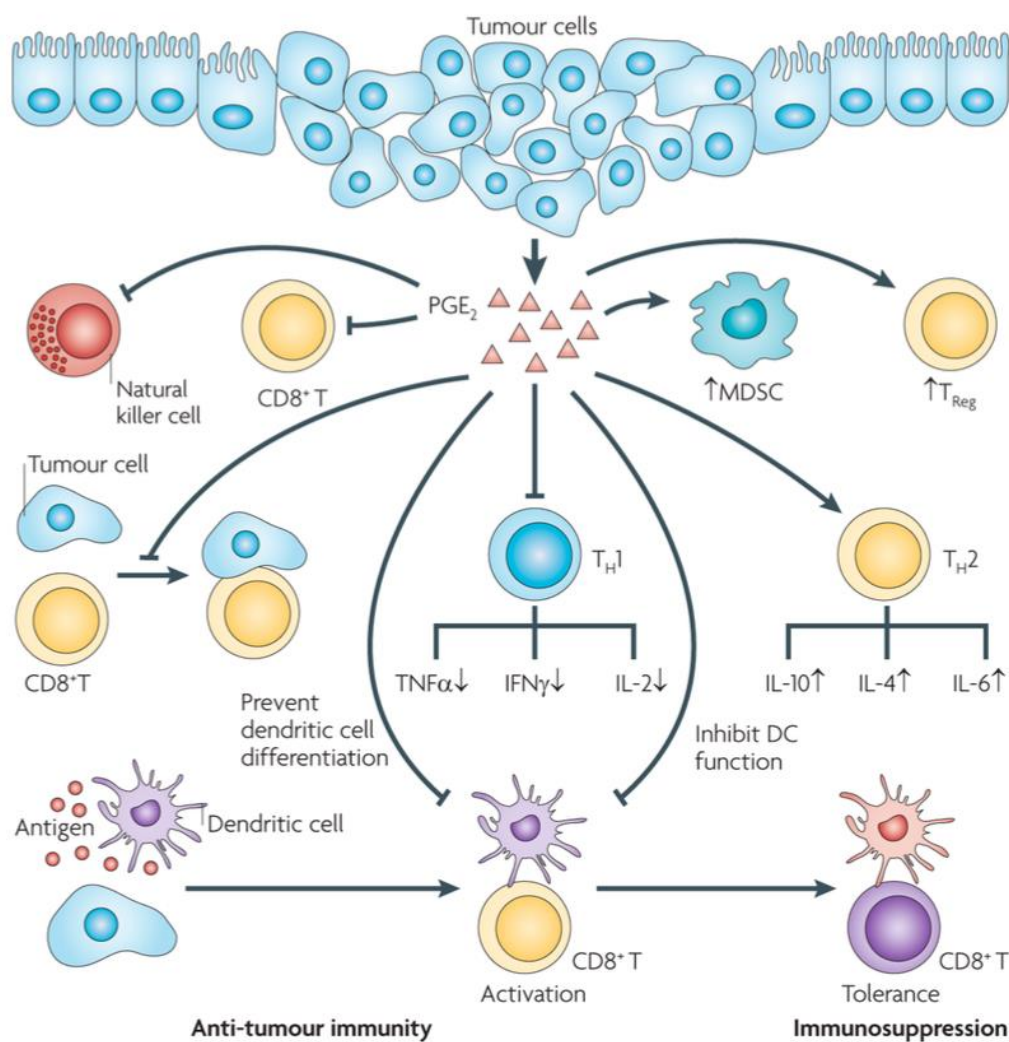


Figure 22 : La PGE₂ participe à l'immunosuppression des tumeurs (Wang et Dubois, Nature Review Cancer, 2010)⁴³⁸.

De plus la PGE₂ altère les capacités de présentation de l'Ag des cellules tumorales aux LT CD8, inhibe la différenciation des DC et favorise l'apparition d'un phénotype tolérogène des DC⁴³⁸. La délétion du gène codant pour le récepteur de la PGE₂ a montré des résultats prometteurs dans l'inhibition de la croissance tumorale dans des modèles précliniques⁴⁴³. Plus récemment, ce concept a été renforcé par une étude qui a mis en évidence que la délétion génétique de COX ou PGE₂, dans des modèles murins de mélanome, cancer du sein et colorectal, rétablit l'immunité anti-cancéreuse et que cet effet est synergique avec celui du blocage de PD-1.

4. Blocage du cycle de l'immunité du cancer

Les cellules tumorales et immunes immunosuppressives ainsi que les molécules inhibitrices régulent négativement le développement de la réponse spécifique en atteignant le cycle de l'immunité du cancer à plusieurs étapes (Figure 23).

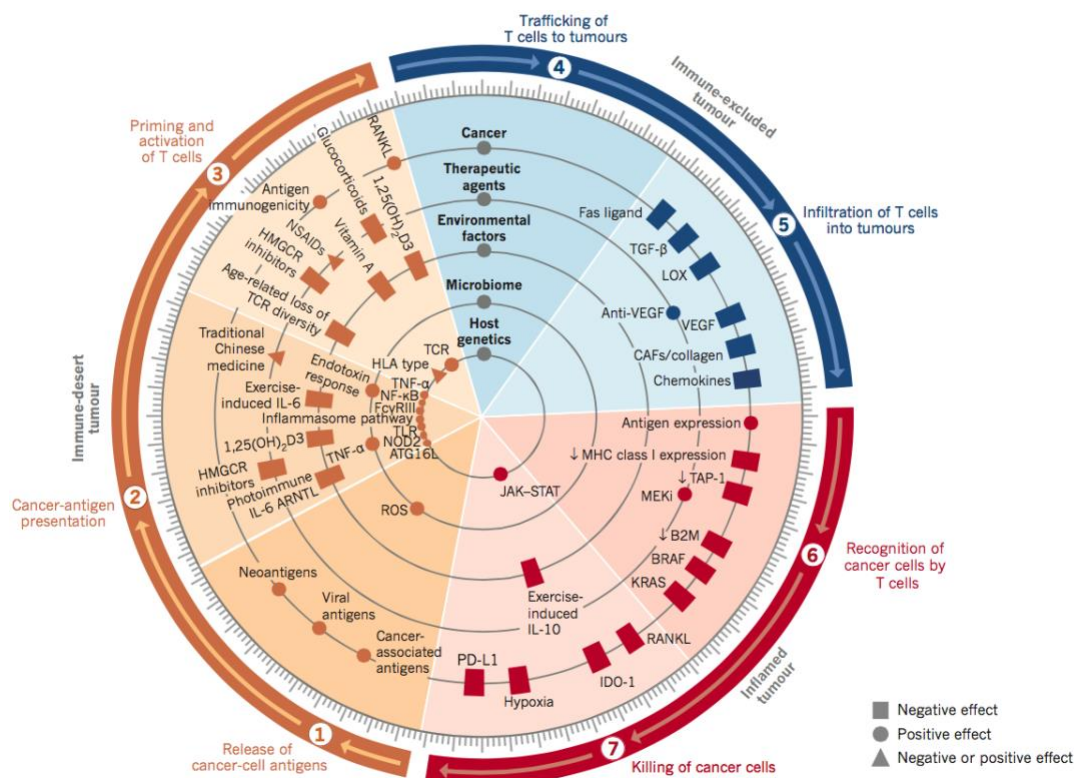


Figure 23: Facteurs qui influencent le cycle de l'immunité du cancer (Chen et Mellman, Nature review, 2017)⁸⁴.

4.1 Perte d'immunogénicité ou de reconnaissance des cellules tumorales

Le cycle de l'immunité du cancer peut ne pas s'enclencher ou les cellules tumorales peuvent ne pas être reconnues par les CTL du fait de la perte d'expression des Ag tumoraux qui peut se produire de trois façons : (i) par l'émergence de cellules tumorales qui n'expriment pas d'Ag immunogènes, (ii) par la perte d'expression des protéines du CMH-I, ou (iii) par la perte de la fonction de transformation de l'Ag en peptides, nécessaire pour produire l'épitope antigénique et le charger sur les molécules du CMH-I. Toutes ces altérations sont probablement dues à l'instabilité

génétique des cellules tumorales et au processus de sélection immunitaire^{332,444}. En effet, comme énoncé précédemment, par un processus de sélection darwinienne, les cellules tumorales faiblement immunogènes deviennent "invisibles" pour le SI et acquièrent ainsi la capacité de croître progressivement. De plus, la résistance des cellules cancéreuses aux molécules cytotoxiques et aux CTL, comme indiqué ci-dessous, diminue la libération de signaux de danger et d'Ag qui doivent être pris en charge par les DC. Ces mécanismes ont pour conséquence une diminution de la reconnaissance immunitaire.

4.2 Défaut de maturation des DC

Les tumeurs ont un puissant effet délétère sur les DC et leur dysfonction est souvent associée à leur immaturité⁴⁴⁵. Les DC infiltrant la tumeur expriment des marqueurs de macrophages et monocytes immatures, ce qui indique un recrutement de précurseurs myéloïdes ayant subi une différenciation incomplète⁴⁴⁶. Le VEGF présent au site tumoral est capable d'altérer à la fois la fonction et la maturation des DC³⁹⁶. En effet, chez les patients, il a été démontré que le traitement par des AcM bloquant le VEGF (bevacizumab), permettait d'inverser les défauts de maturation des DC⁴⁴⁷. De plus, dans le cancer de l'ovaire, le VEGF et l'IL-10 affectent la fonction des DC associées à la tumeur en induisant l'expression du RI PD-L1 à leur surface⁴⁴⁸. D'autres médiateurs solubles dérivés de tumeurs tels que le TGF- β , l'IL-10, le GM-CSF, l'IL-6 et l'acide lactique ainsi que l'hypoxie peuvent également perturber la maturation des DC⁹³. Ces DC immatures expriment des niveaux intermédiaires de CMH-I et -II et de molécules de co-stimulation, ainsi que des quantités élevées de molécules immunosuppressives telles que l'IDO et la PGE₂, ils ne parviennent donc pas à stimuler efficacement les LT. Cette immaturité des DC provoque une tolérance tumorale induisant une anergie des LT et/ou une expansion des Treg dans les LN et la tumeur, les DC sont alors nommés tolérogènes⁴⁴⁹. Enfin, les DC défectueuses ne sécrètent pas les chimiokines nécessaires au recrutement des cellules effectrices au site tumoral⁴⁵⁰. Les DC isolées de patients atteints de cancer du sein, des VADS et du poumon qui ont présenté une altération fonctionnelle étaient associées à des tumeurs plus agressives⁴⁴⁷.

4.3 Perte d'attraction des LT au site tumoral

Les tumeurs développent diverses stratégies pour supprimer le recrutement des LT au site de la tumeur. Les mécanismes exacts n'ont pas été entièrement élucidés, mais la

perturbation de l'expression des chimiokines au site tumoral semble être le principal facteur. Dans un modèle murin de tumeur cutanée, il a été démontré que la signalisation aberrante du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), supprime la production de CCL27, une chimiokine exprimée par les kératinocytes normaux, ce qui empêche le recrutement des LT et accélère la croissance tumorale⁴⁵¹. Les modifications post-traductionnelles dans les cellules tumorales, comme des changements de clivage, la glycosylation ou la désamination, pourraient entraîner une altération de l'activité des chimiokines⁴⁵². Par exemple, la CCL2, une chimiokine importante pour le recrutement des CTL au niveau de la tumeur, subit une nitrosylation induite par des espèces azotées réactives qui inhibent sa capacité à attirer des CTL spécifiques de la tumeur. Néanmoins, la capacité de la CCL2 modifiée à attirer des MDSC vers la tumeur est conservée⁴⁵³. De plus, une altération de la CXCL11, une chimiokine qui recrute les LT effecteurs CXCR3⁺, peut inhiber sa liaison et sa signalisation et finalement réduire la migration des LT⁴⁵⁴.

4.4 Défaut d'entrée des LT dans la tumeur

Comme décrit précédemment, les LT suivent le processus d'extravasation afin de passer des vaisseaux HEV, ou autres capillaires, au site tumoral. Cependant, dans le TME, les facteurs de croissance angiogéniques inhibent l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales^{455,456}. En effet, bien que le TNF- α soit un activateur des cellules endothéliales et de l'adhésion des LT, en présence de FGF ou VEGF, l'adhésion des LT est réduite puisque le TNF- α est incapable d'induire l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 sur les cellules endothéliales. Les endothélines (ET) ET-1, -2, -3 et -4 et leurs récepteurs (ET_A et ET_B) sont régulés à la hausse dans un certain nombre de cancers⁴⁵⁷. Les ET sont de puissants régulateurs de la biologie des cellules endothéliales, elles favorisent la prolifération et la protection contre l'apoptose des cellules tumorales ainsi que la vascularisation et la dissémination métastatique des tumeurs. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs aux ET ralentit la croissance des tumeurs dans des modèles murins et chez les patients. Il a été montré que l'ET-1 se lie à l'ET_B, inhibe l'expression d'ICAM-1, supprime l'adhésion à l'endothélium vasculaire et par conséquent l'infiltration des LT dans les tumeurs⁴⁵⁸. La surexpression de l'ET_B a été identifiée dans les tumeurs ovariennes dépourvues de TIL et associée à une faible survie. Les effets immunosuppresseurs du VEGF et de l'ET_B sur l'endothélium des

tumeurs semblent être médiés par le NO. Des antagonistes spécifiques du NO et l'inhibition de la NOS peuvent abroger la dérégulation des molécules d'adhésion induite par VEGF et/ou ET_B et rétablir l'adhésion des LT^{456,458}. Les cellules endothéliales expriment également des médiateurs comme FasL, TRAIL et CD31 qui induisent l'apoptose des LT. Elles peuvent également exprimer des molécules immunosuppressives telles que PD-L1, PD-L2⁴⁵⁹, B7-H3, TIM-3, IL-10, TGF- β et PGE₂⁹³. De plus, elles sont capables d'exprimer de l'IDO et de l'ARG qui sont responsables de dérégulations du métabolisme des LT. Ainsi, les cellules endothéliales au site tumoral ont une fonction immunosuppressive qui est maintenue par les cellules tumorales grâce à des mécanismes paracrines⁴⁶⁰.

4.5 Rencontre LT/cellules tumorales altérée

Une fois que les LT ont franchi les barrières vasculaires, ils sont confrontés à un certain nombre de facteurs immunosuppresseurs qui empêchent une reconnaissance et/ou une attaque efficace des cellules tumorales. Comme décrit précédemment, les tumeurs parviennent à diminuer la présentation des peptides antigéniques. Par conséquent, les LT reconnaissent difficilement les épitopes dont ils sont spécifiques sur les cellules tumorales. De plus, une résistance aux effets cytotoxiques, par l'induction de mécanismes anti-apoptotiques impliquant le facteur de transcription STAT3 ou la molécule BCL-2, est établie dans les cellules cancéreuses⁴⁶¹. Les tumeurs expriment des ligands de mort cellulaire FasL et TRAIL qui peuvent tuer directement les LT. Le TME est très toxique pour le fonctionnement optimal des CTL. Les tumeurs sécrètent des médiateurs solubles, tels que TGF- β , IL-10, PGE₂, histamine et Ado, qui peuvent directement inhiber les CTL (les mécanismes sont décrits dans la partie 3.2). La privation des substrats métaboliques, du fait de leur consommation compétitive ou leur déplétion par des enzymes telles que l'IDO et l'ARG, peut atténuer la fonction des LT. Enfin, les conditions hypoxiques et le pH extracellulaire acide peuvent avoir un effet négatif sur la fonction des CTL. Les cellules tumorales expriment également des RI comme PD-L1, PD-L2 et B7-H4 qui inhibent les LT et bloquent le rejet de la tumeur. Les récepteurs apparentés à ces ligands, exprimés par les LT ainsi que leurs mécanismes d'inhibition sont détaillés dans la partie suivante.

5. Points de contrôle de l'immunité

Après reconnaissance de l'Ag par le TCR, l'amplitude et la qualité de la réponse immune sont régulées par un équilibre entre des signaux de co-stimulation et d'inhibition. Suite à leur amorçage dans les LN ou lors de réponses inflammatoires dans les tissus, les LT expriment des RI de type PCI. Dans les conditions physiologiques, ces PCI maintiennent la tolérance du soi et contrôlent l'étendue et la durée de la réponse effectrice, ce qui empêche le développement de maladies auto-immunes et les dommages tissulaires. Dans le cancer, les PCI réduisent l'amplitude de l'activation des LT et limitent leurs fonctions effectrices. En régulant à la hausse les ligands des PCI, les cellules tumorales bloquent les réponses immunitaires anti-tumorales dans le microenvironnement de la tumeur. Les RI étudiés aujourd'hui sur les LT ont été décrits pour la première fois dans les NK au début des années 1990⁴⁶². A cette époque, deux familles de RI étaient décrites : la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et la superfamille des lectines de type C. Depuis, de nombreux PCI ont été identifiés, ils possèdent des signalisations moléculaires intracellulaires spécifiques (Figure 24)⁴⁶³. La plupart des récepteurs inhibiteurs contiennent les motifs inhibiteurs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et/ou ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) dans leurs domaines intracellulaires. Les PCI interviennent différemment dans l'évolution d'une réponse immunitaire. Trois mécanismes d'action majeurs des PCI sont décrits⁴⁶⁴ : ils agissent : (i) par compétition avec les récepteurs de co-stimulation pour se lier à des ligands communs exprimés par les CPA, (ii) en interférant avec les voies de signalisation en aval des récepteurs co-activateurs ou du TCR et (iii) en augmentant l'expression des gènes impliqués dans le dysfonctionnement des LT.

Dans cette partie, les RI CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3 et LAG-3 ainsi que l'ectonucléotidase CD39 sont également détaillés. D'autres PCI ont été identifiés mais nettement moins étudiés, parmi eux ; 2B4 (CD244), CD160, BTLA, NKG2A, Neuropilin-1⁴⁶⁵.

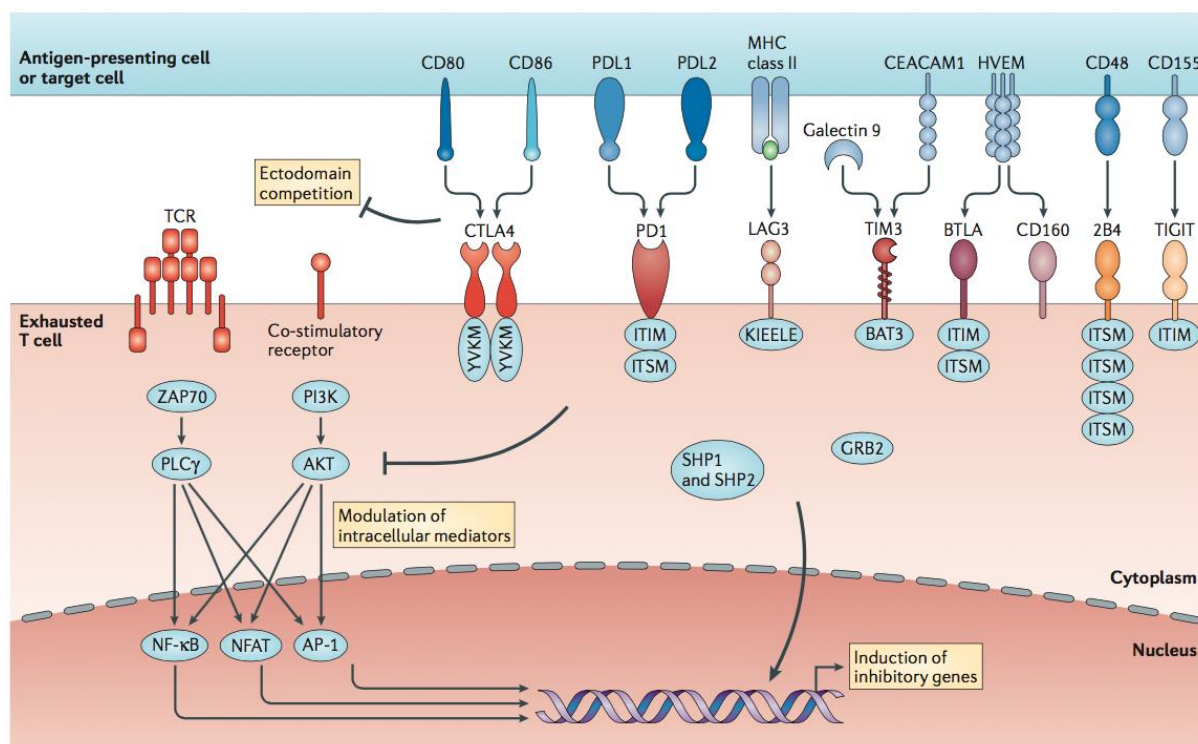


Figure 24: Voies de signalisation des PCI dans les LT (Wherry et Kurachi, Nature Reviews Immunology, 2015)⁴⁶³.

5.1 CTLA-4

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated Antigen 4) ou CD152, est exclusivement exprimé par les LT et agit au stade précoce de l'activation des LT. Il a été découvert en 1987 un membre de la superfamille des Ig exprimé par les LT^{466,467}. Il possède un motif intracellulaire spécifique, appelé YVKM, qui interagit comme la signalisation en aval du CD28, avec la PI3-kinase et régule négativement la croissance cellulaire⁴⁶⁸. CTLA-4 transmet également des signaux inhibiteurs intracellulaires en interagissant avec les phosphatases PP2A et SHP-2. CTLA-4 bloque le signal positif déclenché par CD28 dans les LT en rivalisant pour les mêmes ligands CD80/86, avec une affinité dix fois supérieure⁴⁶⁹. De plus, CTLA-4 est capable de piéger CD80/CD86 par trans-endocytose et de les dégrader⁴⁷⁰. L'expression de CTLA-4 est induite dès l'amorçage des LT (Figure 25a)⁴⁷¹. Son niveau d'expression dépend de l'amplitude de la signalisation initiale médiée par le TCR. En effet, les Ag de haute affinité induisent des niveaux d'expression plus élevés de CTLA-4, ce qui atténue l'amplitude de la réponse. Les LT naïfs et mémoires expriment des niveaux élevés de CD28, mais n'expriment pas CTLA-4 à leur surface. En effet, CTLA-4 est séquestré dans des vésicules intracellulaires et transporté à la surface après engagement du TCR. Plus la

stimulation par le TCR (et le CD28) est forte, plus la quantité de CTLA-4 qui se dépose à la surface des LT est importante. Par conséquent, CTLA-4 fonctionne comme un amortisseur de signal pour maintenir un niveau constant d'activation des LT face à des concentrations et des affinités de ligand très variables pour le TCR. CTLA-4 est en revanche exprimé constitutivement par les Treg sous le contrôle de FOXP3 et a un rôle dans l'immunosuppression et la tolérance⁴⁷². Bien que CTLA-4 diminue les fonctions effectrices des LT CD4 et CD8, il augmente la capacité de suppression des Treg. En effet, le blocage de CTLA-4 sur les Treg et les LT effecteurs a un effet anti-tumoral synergique par rapport au simple blocage de CTLA-4 sur les LT effecteurs⁴⁷³. De plus, les Treg CTLA-4⁺ induisent la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur les CPA et réduisent ainsi l'activation des LT⁴⁷⁴. Par conséquent, le PCI CTLA-4 diminue l'activation des LT, affaiblit l'efficacité des CPA et augmente l'immunosuppression des Treg.

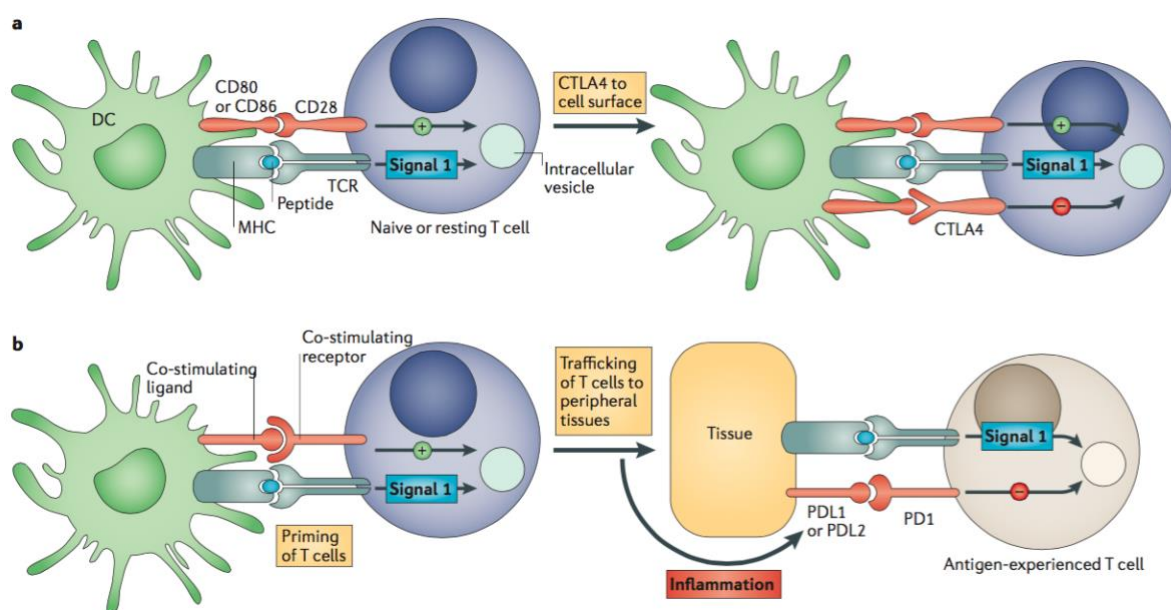


Figure 25: CTLA-4 et PD-1 dans l'évolution de la réponse immune (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012)⁴⁷¹.

5.2 PD-1

Le gène *PDCD1* codant pour PD-1 (programmed cell death protein 1) ou CD279 qui est membre de la superfamille des Ig, a été isolé pour la première fois en 1992 lors d'un criblage de gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée⁴⁷⁵. PD-1 est exprimé à la surface des LT activés, des LB, des NK, des macrophages et de certaines populations de DC. Ses ligands sont PD-L1 (ou B7-H1) et PD-L2 (ou B7-DC)⁴⁷⁶. Dans

de nombreux types tumoraux, on retrouve PD-1 largement exprimé par les TIL⁴⁷⁷ et PD-L1 plutôt que PD-L2, surexprimé à la surface des cellules tumorales⁴⁷⁸ et myéloïdes⁴⁴⁸. L'expression forcée de PD-L1 sur les cellules tumorales de souris inhibe les réponses par les LT anti-tumoraux⁴⁷⁹. Deux mécanismes de régulation de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales ont émergé : la résistance immunitaire innée et la résistance immunitaire adaptative⁴⁷¹. Dans le premier cas, PD-L1 peut être induit par des voies de signalisation oncogènes constitutives impliquant AKT et STAT3. Dans le deuxième cas, les cellules tumorales se protègent et s'adaptent aux attaques immunitaires spécifiques. En effet, l'expression de PD-L1 est induite en réponse à des signaux inflammatoires, comme l'IFN- γ produit lors d'une réponse CTL ou Th1⁴⁸⁰. Des études ont démontré que l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales est fortement associée à l'infiltration lymphocytaire et l'expression d'IFN- γ . Cette corrélation a été observée dans les tumeurs totales mais aussi au sein de régions intra-tumorales. En effet, les TIL et PD-L1 co-localisent dans la tumeur⁴⁸¹. La résistance adaptative est plus fréquente, elle peut être un mécanisme commun pour l'expression de molécules impliquées dans le contrôle des réponses anti-tumorales et participe à l'échappement au SI.

PD-1 est exprimé par les LT activés et contrairement à CTLA-4, il n'agit pas au stade initial d'activation, mais plutôt lors de réponses inflammatoires dans les tissus (Figure 25b). La liaison de PD-1 à ses ligands inhibe la prolifération et les fonctions effectrices des LT⁴⁸². La signalisation de PD-1 implique les motifs inhibiteurs ITIM et ITSM (Figure 24). Par l'intermédiaire de phosphatases, par exemple SHP-2⁴⁷⁶, la voie de signalisation de PD-1 interagit avec des kinases impliquées dans l'activation des LT et altère la signalisation TCR⁴⁸³ et les co-stimulations CD28⁴⁸⁴ et ICOS⁴⁸⁵. Une diminution de la phosphorylation de diverses molécules de signalisation communes à ses voies a été signalée. Récemment, il a été démontré, par une combinaison de reconstitutions biochimiques *in vitro*, que la cible immédiate de l'inhibition par PD-1 dans les LT est la voie de co-stimulation CD28⁴⁸⁶. Une autre étude a montré chez les patients traités par des AcM bloquant le PD-1, que la co-stimulation CD28 sur les LT CD8 est requise pour leur réponse à la thérapie⁴⁸⁷. De plus, comme l'engagement du PD-1 inhibe la signalisation TCR, cette voie pourrait écourter le contact LT/CPA ou LT/cellule cible⁴⁸⁸. En parallèle, tout comme CTLA-4, PD-1 est fortement exprimée sur les Treg et peut augmenter leur prolifération⁴⁸⁹.

Les deux RI les plus étudiés sont CTLA-4 et PD-1. Le blocage de ces PCI ou du ligand PD-L1, par des AcM bloquants, a largement fait ses preuves dans la régénération de l'immunité anti-tumorale amenant au contrôle de la progression tumorale dans des modèles précliniques et lors d'essais cliniques (chapitre 3, partie 4.1). Les inhibiteurs de PCI prennent une place de plus en plus importante dans la prise en charge des patients atteints de cancer, leur utilisation en clinique est détaillée dans le chapitre 3, parties 5 et 6.

5.3 TIGIT

TIGIT (T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains) est exprimé par les LT activés, les NK et les Treg. Il se lie à deux ligands, CD155 et CD112 qui sont exprimés par les cellules tumorales et les CPA, ainsi qu'à Fap2, une protéine dérivée d'une bactérie intestinale. TIGIT participe à un réseau de régulation complexe impliquant plusieurs récepteurs (Figure 26).

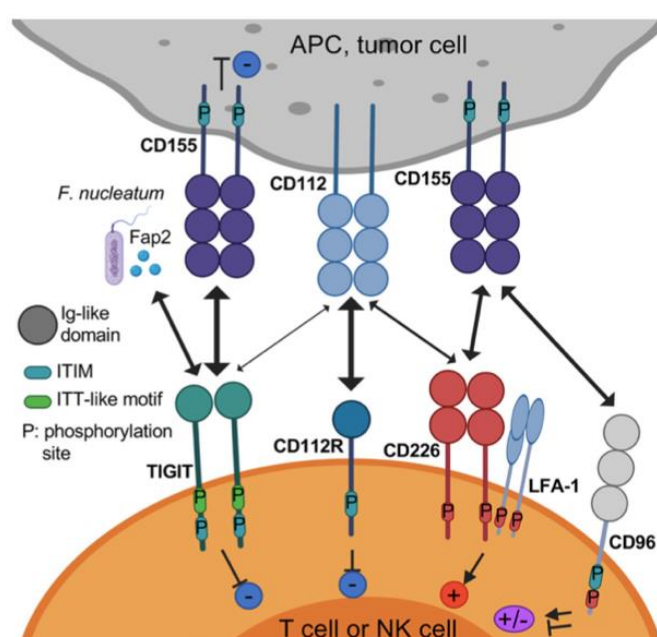


Figure 26: L'axe TIGIT / CD226 / CD96 / CD112R. (Chauvin et Zarour, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020)⁴⁹⁰.

En effet, CD155 se lie également aux récepteurs co-stimulateurs CD226 et CD96. CD112 quant à lui, se lie aussi au CD226 et au CD112R, avec une meilleure affinité pour ce dernier. CD226, CD96 et CD112R sont exprimés sur les LT activés et les NK. Dans le cancer, TIGIT est co-exprimé avec PD-1 et d'autres PCI sur les LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux épuisés^{491,492}. TIGIT est un récepteur de la superfamille

des Ig, composé d'une queue cytoplasmique avec deux motifs inhibiteurs ITIM et ITT (Ig Tail-Tyrosine). Lors de la liaison TIGIT / CD155, le motif ITT est phosphorylé, se lie à des adaptateurs cytosoliques (Grb230 et β -arrestine) pour recruter SHIP-1 qui bloque plusieurs voies de signalisation⁴⁹³. TIGIT inhibe l'immunité innée et adaptative grâce à de multiples mécanismes :

- Il inhibe indirectement les LT en se liant à CD155 sur les DC favorisant l'induction de DC tolérogènes avec une production réduite d'IL-12 et accrue d'IL-10⁴⁹⁴.
- Il inhibe la prolifération et la fonction des LT en atténuant les signaux en aval du TCR⁴⁹⁵ ainsi que la dégranulation des NK⁴⁹⁶.
- Il empêche l'activation du CD226 ; i) par compétition de liaison au CD155, en effet TIGIT lie CD155 avec une affinité plus élevée et ii) par liaison directe au CD226, perturbant son homodimérisation et sa capacité de liaison au CD155⁴⁹².
- Il augmente les fonctions immunosuppressives des Treg⁴⁹⁷.
- Il se lie à la protéine Fap2 libérée la bactérie intestinale *Fusobacterium nucleatum* pour déclencher des signaux inhibiteurs⁴⁹⁸.

Bien que le blocage de TIGIT seul n'ait pas d'effet significatif sur la croissance tumorale, le double blocage de TIGIT et PD-1 augmente la prolifération et la fonction des LT CD8 anti-tumoraux chez la souris et les patients⁴⁹¹ et entraîne un rejet de la tumeur et une survie prolongée dans des modèles murins⁴⁹². Ces résultats soutiennent le développement d'essais cliniques en cours avec le double blocage PD-1 / TIGIT chez les patients atteints de cancer⁴⁹⁹. Il est à noter que l'équilibre TIGIT / CD226 est important dans la régulation de la fonction effectrice des LT et NK. En effet, chez des souris porteuses de tumeurs CT26, les effets anti-tumoraux du double blocage PD-L1 / TIGIT se produisent de manière dépendante de CD226 et sont abolis lors du blocage de CD226⁴⁹², ce qui suggère que le blocage de TIGIT agit principalement en orientant la signalisation médiée par CD155 vers l'activation de CD226. Cependant, la régulation à la baisse de l'expression de CD226 des TIL et NK dans la tumeur peut représenter un obstacle majeur au succès du blocage PD-1 / TIGIT en clinique. D'autre part, le blocage de TIGIT favorise l'activité anti-tumorale des NK *in vitro* et *in vivo*⁴⁹³. Une étude récente chez la souris suggère que le blocage de TIGIT seul ou avec celui de PD-1 agit principalement sur les NK pour augmenter les réponses anti-tumorales des LT CD8 et empêcher la croissance tumorale⁵⁰⁰.

5.4 TIM-3

TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3), codé par le gène *HAVCR2* était à l'origine découvert comme récepteur activateur. Cependant, la perte de fonction de TIM-3 a plus tard été associée à des pathologies inflammatoires, définissant TIM-3 comme un RI⁵⁰¹. De plus, TIM-3 est un biomarqueur de pronostic négatif dans différents types de tumeurs⁵⁰². Plusieurs facteurs de transcription comme T-bet et Nfil3 ainsi que des signaux du microenvironnement de la tumeur qui peuvent coopérer avec l'IL-27 ont été impliqués dans l'induction de l'expression de TIM-3 sur les LT⁵⁰³. TIM-3 est co-exprimé avec d'autres PCI, tels que PD-1, LAG-3 et TIGIT sur les LT CD4 et CD8⁵⁰⁴. Dans le cancer, l'expression de TIM-3 marque le sous-ensemble le plus dysfonctionnel des LT CD8 et, parmi les DC, l'expression de TIM-3 est la plus élevée dans les cDC1⁵⁰⁵. TIM-3 est également exprimé par les Treg à des niveaux élevés, qui présentent alors un phénotype plus suppressif et sont associés à des métastases ganglionnaires⁵⁰⁶. Quatre ligands de TIM-3 ont été identifiés. On retrouve principalement la galectine-9, une protéine produite par les cellules immunitaires, endothéliales et les fibroblastes qui est régulée à la hausse par l'IFN- γ . La liaison TIM-3/galectine-9 joue un rôle essentiel dans le cancer, elle contribue largement aux dysfonctions immunitaires et est associée à un mauvais pronostic⁵⁰⁷. TIM-3 se lie également : à la phosphatidylsérine, exposée à la surface des cellules apoptotiques, au signal de danger HMGB1 qui se lie seul ou en complexe avec l'ADN ou le LPS et au CEACAM-1 exprimé à des niveaux élevés sur les LT, DC, monocytes, macrophages et cellules tumorales⁵⁰⁸. Lors de l'activation des LT, TIM-3 est recruté dans la synapse immunologique, la protéine Bat3 se lie à sa queue cytoplasmique et recrute la forme active de la protéine Lck qui active la voie de signalisation sous le TCR, favorisant la prolifération et la survie des LT. Lorsque TIM-3 se lie à un de ses ligands, les résidus tyrosine conservés dans la queue cytoplasmique sont phosphorylés, conduisant à la libération de Bat3 et le recrutement de tyrosine phosphatases (CD45 et CD148), ce qui conduit à la déphosphorylation de Lck et à une régulation négative des LT^{509,510}. Au niveau des DC, TIM-3 peut séquestrer HMGB1 ou activer Btk et c-Src, ceci entraîne le blocage de l'activation des DC. TIM-3 diminue également la production de CXCL9 par les DC, réduisant ainsi le recrutement des LT CD8 dans la tumeur⁵⁰⁵. Une augmentation de l'expression de TIM-3 favorise la polarisation des macrophages M2 dans un modèle murin de cancer⁵¹¹. Les NK

expriment de manière constitutive TIM-3 qui peut également fonctionner comme un PCI⁵¹². Dans les modèles précliniques, le double blocage de TIM-3 et PD-1 a montré son efficacité dans l'amélioration de l'immunité anti-tumorale dans les tumeurs solides⁵¹³ et hématologiques⁵¹⁴. En parallèle, la régulation à la hausse de TIM-3 a été associée à une résistance au blocage de PD-1 dans des échantillons de patients et des modèles précliniques⁵¹⁵. Cela a conduit à la mise en place d'essais cliniques dans différents types de cancers associant des anti-PD-1 et anti-TIM-3⁵⁰⁸.

5.5 LAG-3

LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) ou CD223, présente des similitudes structurales avec le CD4. Il fonctionne à travers un motif KIEELE dans sa queue cytoplasmique pour réguler négativement la prolifération et l'homéostasie des LT⁵¹⁶. Cependant les mécanismes exacts de sa signalisation sont inconnus. Son expression peut être induite sur les LT CD4 et CD8 lors de la stimulation antigénique⁵¹⁷. LAG-3 est également exprimé par les LT $\gamma\delta$, les NKT, les pDC et les LB. L'IL-2, l'IL-7 et l'IL-12 ainsi que les facteurs de transcription NFAT, NR4A et TOX augmentent l'expression de LAG-3 sur les LT activés⁵¹⁸. D'autre part, il a été signalé que T-bet réprime son expression⁵¹⁹. LAG-3 se lie sélectivement aux CMH-II stables, en conséquence il inhibe préférentiellement l'activation des LT CD4, non pas par compétition de liaison, mais par inhibition de l'activation des LT en générant des signaux inhibiteurs par la région intracellulaire⁵²⁰. L'impact de sa liaison au CMH-II sur l'activation des LT CD8 n'a pas été élucidé. Récemment, il a été démontré que l'activation des LT CD8 est faiblement inhibée lorsque les CPA expriment une forte quantité de CMH-II stable⁵²⁰. La galectine-3 et la LSECtine, qui ont été indiquées pour interagir avec les glycanes sur le LAG-3, ainsi que la protéine FGL1, sont également des ligands du LAG-3⁵²¹. LAG-3 est fortement exprimé par les TIL épuisés dans de nombreux cancers⁵²². Les Treg LAG-3⁺ dans le sang périphérique et les tumeurs de patients atteints de cancer produisent des niveaux élevés de cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β et inhibent les LT spécifiques des tumeurs⁵²³. L'infiltration des cellules LAG-3⁺ dans les tumeurs est associée à la progression de la tumeur, à un mauvais pronostic et à des résultats cliniques défavorables dans divers types de tumeurs humaines⁵²¹.

Le blocage de LAG-3 seul pendant une infection chronique par le LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) a peu d'effet sur la fonction des LT⁵²⁴. Il a été démontré que

LAG-3 agit en synergie avec le PD-1 pour supprimer l'immunité anti-tumorale⁵²⁵. Dans cette étude, les auteurs montrent que chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, le double blocage de LAG-3 et PD-1 augmente la prolifération et la production de cytokines des TIL CD8 lors de stimulation *ex vivo* avec l'Ag NY-ESO-1. Ce co-blocage permet également de réduire la proportion de Treg et de diminuer la croissance tumorale dans un modèle murin de récurrence de mélanome⁵²⁶. De nombreux essais cliniques sont en cours pour valider les thérapies ciblant LAG-3⁵²⁷.

5.6 CD39

CD39 est une ectonucléotidase codée par le gène *ENTPD1* (ectonucléoside triphosphate diphospho-hydrolase-1) qui clive l'ATP et l'ADP en AMP. L'AMP est ensuite converti en Ado par la 5'-ectonucléotidase CD73 codée par le gène *NT5E*. Contrairement aux PCI, l'activation de CD39 n'est pas dépendante de la liaison à un ligand et n'inhibe pas directement le LT sur lequel il est exprimé. L'activité de CD39 permet plutôt une réduction de la disponibilité en ATP extracellulaire, indispensable pour la prolifération des LT et l'activation des DC et macrophages et contribue, avec le CD73, à la formation d'Ado immunosuppressive dans le microenvironnement de la tumeur. CD39 est exprimé par plusieurs types cellulaires et impacte l'immunité anti-tumorale de plusieurs manières (Figure 27). Il est à noter que l'activité de CD39 est réversible par les actions de la NDP kinase et de l'adénylate kinase, alors que l'activité de CD73 est pratiquement irréversible⁴³². Ces ectonucléotidases peuvent être retrouvées soit exprimées à la surface des cellules soit solubles dans le milieu extracellulaire. Une expression accrue de CD39 a été largement rapportée dans plusieurs types de tumeurs, elle est induite par des cytokines pro-inflammatoires et par le stress oxydatif et l'hypoxie⁴²⁹. L'expression de CD39 sur les cellules tumorales et endothéliales favorise l'angiogenèse et la propagation métastatique, tandis que son expression sur les Treg est cruciale pour supprimer l'activité anti-tumorale des NK et des LT effecteurs^{426,528}. En effet, la surexpression de CD39 dans des modèles murins augmente les métastases hépatiques des tumeurs colorectales⁵²⁹, tandis que le blocage de CD39 avec l'inhibiteur pharmacologique POM1 favorise l'immunité anti-tumorale et diminue les métastases dans plusieurs modèles de tumeurs⁵³⁰.

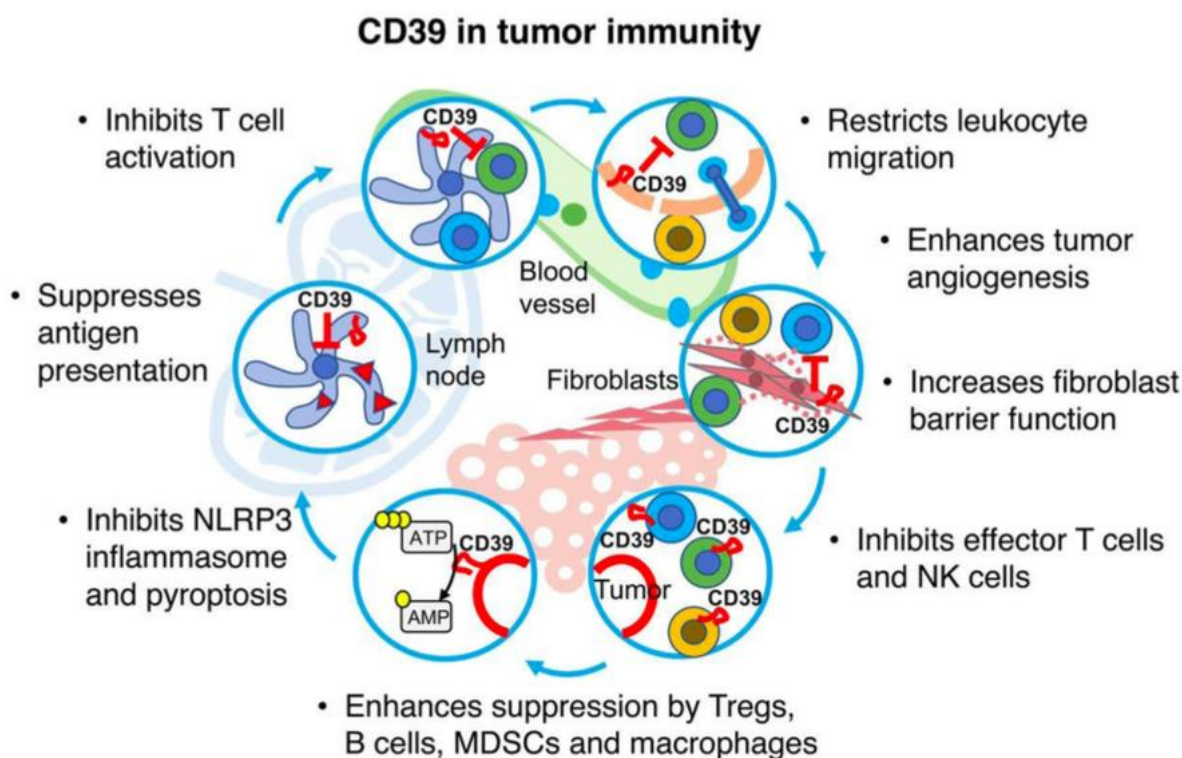


Figure 27: CD39 dans le cycle de l'immunité du cancer (Allard *et al.*, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020)⁵³¹.

Une étude a montré que les Treg chez l'Homme expriment abondamment CD39, mais n'expriment pas CD73, contrairement aux Treg chez la souris qui co-expriment les deux enzymes. L'expression de CD73 dans les LT CD4 humains est restreinte. Les LT CD4 CD73⁺ humains sont enrichis en cellules Th1.17 polyfonctionnelles caractérisées par l'expression de CXCR3 / CCR6 / MDR1 et la production d'IL-17A / IFN- γ / IL-22 / GM-CSF⁵³². Il existe des LT CD4 FOXP3⁻ CD39⁺ présentant un phénotype EM, qui sont présents en plus grande quantité dans le sang périphérique des patients rejetant des allogreffes⁵³³. De plus, l'induction de CD39 sur les LT CD4 a été signalée comme étant induite par l'âge, est associée à un stress métabolique et une augmentation de l'apoptose et contribue à une réponse altérée aux vaccins⁵³⁴. Des études ont montré que les LT CD8 épuisés expriment des niveaux élevés de CD39⁵³⁵ et que sous l'influence du TGF- β et de la stimulation du TCR, CD39 est principalement exprimé dans une sous-population de LT CD8 CD103⁺ réactifs à la tumeur^{536,537}. Les LT CD8 CD39⁺ ont été retrouvés au niveau de la tumeur, des LN et des métastases. L'expression de CD39 par les LT CD8 permet également de contrôler la production d'IFN- γ par les LT CD8 CD39⁻ par un mécanisme nécessitant l'engagement du

récepteur A2A⁵³⁸. Les DC, cellules tumorales et MDSC peuvent co-exprimer CD39 et CD73⁴³¹. En parallèle, l'activité enzymatique de CD73 sur les cellules endothéliales associées à la tumeur restreint l'entrée des LT dans la tumeur⁵³⁹. Les animaux dépourvus de CD73 ont une immunité anti-tumorale efficace et sont résistants à la carcinogenèse.

Jusqu'à présent, peu d'approches ciblant le CD39 en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, une délétion génétique ou des AcM ont donné des résultats prometteurs⁴²⁹. En effet, d'autres enzymes générant de l'AMP, telles que NPP1 ou CD38, peuvent compenser le manque d'activité de CD39 et participer à la génération d'Ado dans le TME. Dans ce contexte, le blocage de la voie en aval de l'hydrolyse de l'ATP, c'est-à-dire de CD73 ou des récepteurs de l'Ado, semblaient plus intéressants⁴³¹. Une étude récente montre que le double blocage de CD39 et CD73 favorise l'immunité anti-tumorale en stimulant les DC et les macrophages et en restaurant l'activation des LT isolés de patients cancéreux⁵⁴⁰. Dans des modèles murins, le ciblage du CD73 seul ou en association avec l'immunothérapie (anti-CTLA-4 ou anti-PD-1) améliore le rejet de la tumeur et bloque les métastases, démontrant que l'Ado peut limiter l'efficacité de ces immunothérapies⁵⁴¹. Sur la base de ces données, des essais cliniques de phase I / II évaluant le blocage de CD73 ou A2A en association avec des inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 sont actuellement en cours. Néanmoins, l'avantage du blocage de CD39, contrairement aux inhibiteurs d'A2A ou de CD73, est de préserver l'ATP immunostimulateur. Des travaux montrent l'intérêt de cibler CD39, notamment dans le contexte d'une sensibilisation aux anti-PD-1. Chez des animaux greffés avec une lignée cellulaire de mélanome B16-F10, une efficacité accrue des traitements anti-PD-1 et anti-CTLA-4 est observée chez les souris déficientes en CD39 en comparaison aux souris WT⁵⁴⁰. Une autre étude montre que la combinaison des anti-PD-1 et anti-CD39 permet de ralentir la progression tumorale dans des modèles murins résistants aux anti-PD-1 en monothérapie⁵⁴². À ce jour, trois AcM antagonistes de CD39 sont en cours d'essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides, principalement en combinaison avec des agents bloquant l'axe PD-1/PD-L1⁵⁴³, ce qui laisse penser que le blocage de cette molécule pourrait avoir un effet thérapeutique chez l'Homme.

6. Épuisement des lymphocytes T

L'épuisement des LT est un terme utilisé pour décrire l'état dysfonctionnel obtenu suite à une stimulation antigénique persistante. Il a d'abord été identifié dans le cadre d'une infection virale chronique, plus récemment il a été décrit en réponse aux tumeurs. L'épuisement prévient l'apparition de pathologies auto-immunes mais empêche le contrôle efficace de la croissance tumorale. Les LT épuisés sont caractérisés par une accumulation de l'expression des PCI mais également par l'expression d'autres molécules spécifiques. Deux sous-types de LT épuisés ont été identifiés, les LT épuisés progéniteurs et terminaux. Actuellement, l'épuisement des LT dans le cancer suscite un grand intérêt puisque la compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire afin d'optimiser les traitements d'immunothérapie.

6.1 Identification

L'expression "épuisement des LT" a été utilisée pour décrire l'état dysfonctionnel des LT CD8 qui persistent mais présentent de faibles fonctions effectrices chez les souris chroniquement infectées par le virus LCMV⁵⁴⁴. La signature moléculaire de ces LT épuisés a été caractérisée par comparaison des LT dans des infections virales aiguës et chroniques⁵⁴⁵. Contrairement à l'infection aiguë, où les LT CD8 deviennent mémoires une fois que l'agent pathogène est éliminé, la stimulation antigénique et l'inflammation persistantes dans le cadre d'une infection chronique entraînent une perte progressive de la fonction des LT CD8 amenant à l'état d'épuisement (Figure 28a). Dans le cancer, les LT épuisés ont été identifiés pour la première fois chez les patients. En effet, les LT spécifiques de la tumeur dans un mélanome métastatique partagent de nombreuses caractéristiques moléculaires avec les LT épuisés retrouvés dans les infections chroniques⁵⁴⁶. Malgré des propriétés communes, des différences marquées ont été identifiées entre le dysfonctionnement des LT dans le cancer et les infections virales chroniques⁵⁴⁷.

6.2 Induction

Les voies impliquées dans la mise en place de l'épuisement interviennent au niveau des trois signaux nécessaires à l'activation des LT⁴⁹⁹. Dans un contexte tumoral, la stimulation persistante du TCR, l'altération de la co-stimulation ou la co-stimulation

négative par les RI, l'inflammation et les médiateurs solubles participent à la mise en place de l'épuisement des LT spécifiques de la tumeur. En effet, comme détaillé précédemment, les diverses populations cellulaires du microenvironnement de la tumeur, ainsi que leur cytokines et métabolites associés, inhibent les LT et sont largement impliqués dans leur épuisement⁴⁶³. De plus, l'absence d'aide des LT CD4 joue également un rôle⁵⁴⁸. L'intensité de ces différents signaux peut être déterminée par des paramètres indirects tels que les mutations dans les cellules cancéreuses, l'hétérogénéité spatiale dans la composition de la tumeur et les altérations du microenvironnement induites par la thérapie⁵⁴⁷. Les signaux immunosuppresseurs agissent au niveau des LT en influençant l'expression des RI, en modifiant les voies métaboliques, l'état épigénétique et les profils des facteurs de transcription, amenant à l'état d'épuisement. Jusqu'à récemment, les PCI étaient décrits comme responsables de l'épuisement des LT puisqu'un lien a été établi entre l'expression de plusieurs PCI et le phénomène d'épuisement⁵⁴⁹. De plus, le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 augmente l'immunité anti-tumorale dans des tumeurs humaines solides⁴⁴⁸. Cependant, leur expression ne correspond pas forcément à une réduction des fonctions des LT, mais peut également marquer des LT activés ou appartenant à des stades de différenciation plus avancés⁵⁵⁰. En effet, des données montrent que PD-1 n'est pas nécessaire pour initier l'épuisement des LT et que l'absence de PD-1 favorise même l'accumulation de LT CD8 épuisés chez la souris⁵⁵¹. Les PCI seuls ne sont pas responsables de l'épuisement des LT mais jouent un rôle crucial dans la régulation des réponses effectrices.

6.3 Caractéristiques

Les LT épuisés ont une perte hiérarchique des fonctions effectrices telles que la diminution de la production de cytokines, l'augmentation de l'expression des chimiokines, la réduction de la cytotoxicité et de la prolifération. On retrouve également des changements dans leurs profils transcriptomique⁵⁵², épigénétique⁴⁹⁹ et métabolique⁵⁴⁷. Les LT épuisés sont caractérisés par une expression élevée et soutenue des PCI tels que PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3 et LAG3⁴⁶⁵. Des modifications progressives de l'accessibilité de la chromatine ont également été identifiées⁵⁵³. Des études comparant les TIL épuisés avec des LT épuisés dans une infection virale chronique et avec des LT non-épuisés, ont identifié des variations d'expression de gènes et de facteurs de transcription comme NFAT, EOMES, T-bet, Blimp-1, BATF,

FoxO1, VHL et c-Maf, dans les TIL épuisés^{545,547,552}, mais aucun marqueur spécifique n'a encore été identifié. Ces changements peuvent s'expliquer par le fait que le TME diffère de celui d'une infection virale. La compréhension de la régulation de l'expression des gènes dans les LT dysfonctionnels est encore compliquée par le fait que plusieurs facteurs de transcription et récepteurs agissent de manière dépendante du contexte, avec une fonction différente dans les LT épuisés^{519,554}. D'autre part, des régulateurs en aval de la signalisation du TCR tels que TOX⁵⁵⁵, IRF4⁵⁵⁶, NR4A1⁵⁵⁷ et NFAT⁵⁵⁸ semblent être impliqués dans l'épuisement des LT. Le facteur de transcription et régulateur épigénétique TOX est induit par une stimulation chronique du TCR et l'activation de NFAT. Des travaux récents ont mis en évidence un rôle important de TOX dans l'induction de l'épuisement des LT dans des infections chroniques du LCMV^{559,560} et dans des modèles murins de cancer^{561,562}. Ces études démontrent que les LT CD8 déficients en TOX ont une fonction effectrice accrue. Toutefois, la perte d'expression de TOX empêche également la persistance de LT CD8 spécifiques de l'Ag dans les infections chroniques. Les LT épuisés peuvent être séparés des autres états de dysfonction des LT tels que l'anergie et la sénescence. En effet, alors que l'anergie est induite au cours de l'activation par un manque de co-stimulation et que la sénescence correspond à un arrêt d'expansion après une stimulation répétitive, les LT épuisés proviennent de cellules qui acquièrent initialement des fonctions effectrices mais qui les perdent progressivement suite à une stimulation excessive et continue du TCR⁵⁶³.

6.4 Lignée de différenciation indépendante

Les LT épuisés représentent une lignée immune distincte de celle des LT mémoires et effecteurs (Figure 28b). Les LT épuisés sont différenciés dans un contexte de stimulation chronique de l'Ag à partir de cellules mémoires précurseurs qui sont des précurseurs communs aux cellules mémoires et effectrices. Certains spécialistes proposent que les LT épuisés peuvent être directement différenciés à partir de cellules naïves. Les LT épuisés se distinguent nettement des LT effecteurs et mémoires au niveau des profils transcriptomiques, de l'expression des RI et co-stimulateurs, des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des récepteurs de cytokines et de chimiokines et des gènes impliqués dans le métabolisme^{545,564,565}. Ainsi, en plus du phénotypage et de l'analyse fonctionnelle, les études génomiques confirment également que les LT épuisés représentent un état unique de différenciation⁴⁶³.

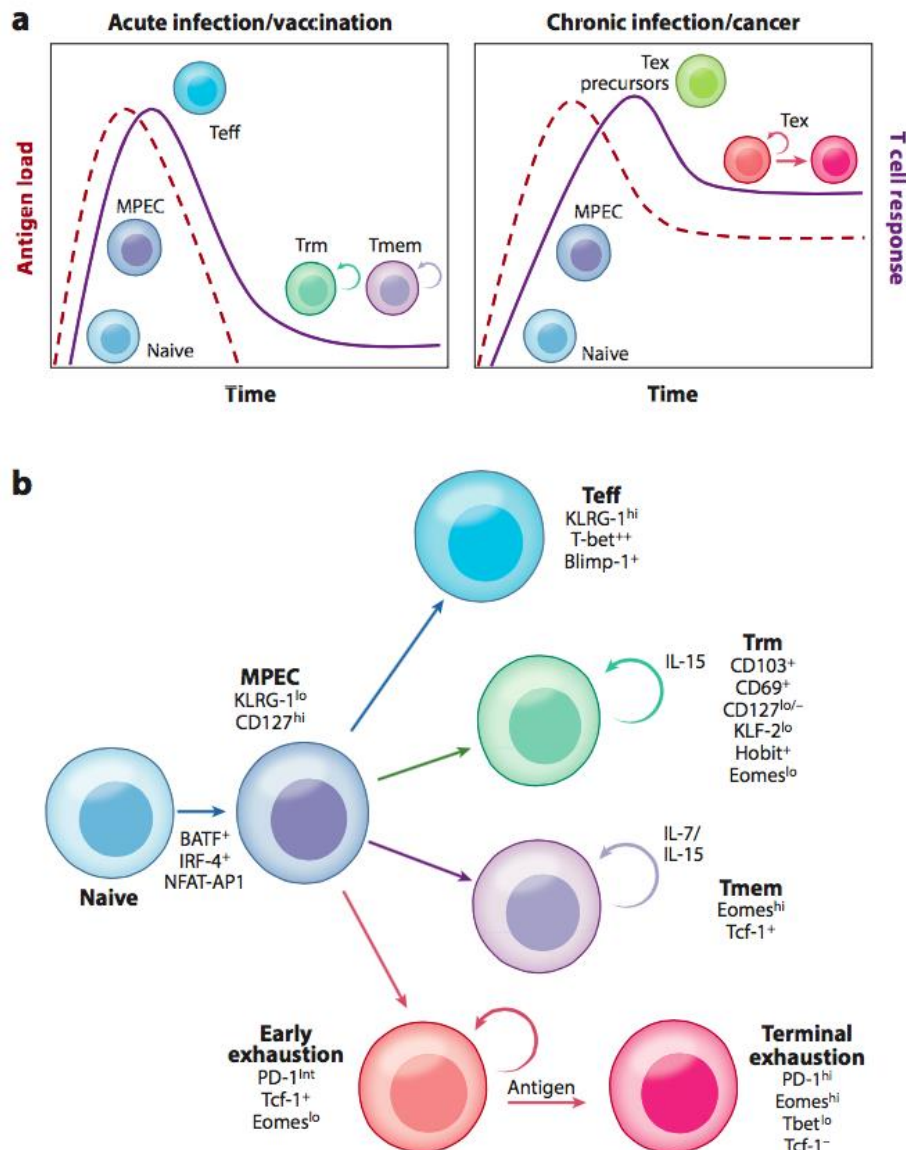


Figure 28 : Modèle d'activation des LT après reconnaissance de l'Ag (McLane *et al.*, Annual Review of Immunology, 2019)⁴⁹⁹.

6.5 Différents degrés d'épuisement

Il existe différents degrés de sévérité de l'épuisement qui sont influencés par le niveau et le nombre de RI exprimés, l'intensité et la durée de la stimulation antigénique et la disponibilité de l'aide des LT CD4⁴⁶³. Plusieurs de ces RI corréleront avec les niveaux de dysfonctionnement des LT. Des études ont montré, grâce à l'analyse de la production de cytokines, que les LT CD8 PD-1⁺TIM-3⁺ sont plus dysfonctionnels que les PD1⁺TIM-3⁻ et que les PD-1⁻TIM-3⁻ ⁵⁴⁹. D'autre part, il a été démontré que T-bet et

EOMES délimitent deux sous-ensembles de LT CD8 épuisés dont des précurseurs capables de prolifération qui maintiennent les populations de LT épuisées⁵⁶⁶. Plus récemment, des études montrent que le facteur de transcription TCF1 permet de distinguer plus strictement ces deux populations de LT épuisés. Les cellules épuisées progénitrices expriment TCF1⁵⁶⁷, SLAMF6⁵⁶⁸ et CXCR5⁵⁶⁹ et peu de RI. En effet, elles expriment des niveaux intermédiaires de PD-1 et n'expriment pas TIM-3. Les cellules progénitrices PD1⁺TCF1⁺ ont des propriétés semblables à celles des cellules souches car elles ont la capacité de proliférer, de s'auto-renouveler et de produire des cellules épuisées en phase terminale décrites comme PD1⁺TCF1⁻TIM-3⁺GZMB⁺ qui n'ont plus la capacité de proliférer.

6.6 LT CD4 épuisés

Les LT CD4 perdent également leur fonction effectrice et augmentent leur niveau d'expression de PD-1 lors d'infections virales chroniques⁵⁶⁵. Cependant, la dysfonction est souvent apparue plus tôt pour les LT CD4 que pour les LT CD8^{570,571}. Les LT CD4 épuisés produisent souvent de l'IL-10 et/ou de l'IL-21 et semblent se différencier en Tfh sous l'influence d'IFN de type I lors d'infections chroniques^{565,572}. L'IL-21 renforce les réponses des LT CD8, ce qui suggère que la différenciation des LT CD4 épuisés implique des régulations plus complexes que celles des LT CD8. Des études récentes, qui ont comparé les programmes de transcription des LT CD4 et CD8 épuisés, ont retrouvé de nombreuses similitudes mais également des différences, notamment dans l'expression des RI et facteurs de transcription. Les LT CD4 épuisés représentent une population hétérogène.

6.7 Techniques d'analyse

Les progrès technologiques récents, notamment les analyses transcriptomiques de cellules uniques, les analyses épigénétiques et le séquençage TCR, ont permis d'analyser l'hétérogénéité et les relations de lignées de différenciation dans les populations de LT spécifiques de l'Ag dans les tumeurs et les infections virales chroniques^{553,555,573}. Une étude combinant l'analyse des profils protéomiques, épigénétiques et transcriptomiques par cytométrie de masse a permis de définir 9 sous-groupes distincts de LT épuisés chez les patients atteints de cancer ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)⁵⁷⁴. L'analyse de l'accessibilité de la

chromatine a également permis de caractériser le profil d'expression de certains gènes dans les LT épuisés⁵⁶². Plusieurs signatures géniques définissant les LT épuisés ont également été définies.

6.8 Réversion

Il a été montré que le blocage thérapeutique de PD-1 peut réactiver les fonctions des LT épuisés dans les infections chroniques⁵⁷⁵. Récemment, une étude dans des modèles murins de cancer a montré que le blocage des PCI permet d'améliorer les fonctions effectrices des LT qui expriment plusieurs PCI ainsi que l'expansion des cellules épuisées progénitrices⁵⁷⁶. De plus, des études montrent que ce sont plutôt les LT CD8 TCF1⁺ qui agissent comme acteurs de la réponse à l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 dans le contrôle de la tumeur^{568,577,578}. L'utilisation des inhibiteurs de PCI ainsi que leurs effets thérapeutiques dans le cancer sont décrits dans la partie suivante.

III) L'immunothérapie

L'immunothérapie fait partie des piliers de traitements anti-cancéreux, avec la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. Elle a pour but d'aider notre SI à combattre le cancer. L'immunothérapie a connu une percée fulgurante ces dernières années et a révolutionné le domaine de l'oncologie. La stimulation du SI du patient pour éliminer le cancer est une idée apparue dans les années 1970. En effet, l'injection du BCG (bacille de Calmette et Guérin) a été efficace chez des patients atteints d'un cancer de la vessie.

Cette approche permet une stimulation globale du SI. Plus tard, l'immunothérapie dirigée spécifiquement contre les cellules cancéreuses est apparue avec le transfert adoptif de TIL et a été poursuivie et renforcée suite à l'identification des Ag tumoraux et leur reconnaissance par les CTL⁵⁷⁹. Aujourd'hui, il existe plusieurs approches d'immunothérapies spécifiques ou non spécifiques, qui sont détaillées ci-après. L'immunothérapie spécifique peut être passive ou active. L'immunothérapie passive, comme les AcM et le transfert adoptif de LT, consiste à injecter des cellules ou molécules du SI qui ont un effet direct sur les cellules tumorales. L'immunothérapie active induit une réponse immune spécifique et une mémoire immunologique, par exemple, les vaccins anti-cancer, les virus oncolytiques et les inhibiteurs de PCI. Il est à noter que certains traitements anti-cancéreux, comme la chimiothérapie, qui permettent d'induire la mort des cellules tumorales, aboutissent à l'activation du SI adaptatif par libération des signaux de danger⁵⁸⁰. De ce fait, la combinaison de thérapies conventionnelles et d'immunothérapies ainsi que leurs potentiels effets synergiques sont largement étudiés. L'immunothérapie permet un traitement de plus en plus personnalisé en fonction du tableau clinique des patients. De plus, les tumeurs inflammées sont connues pour répondre davantage à ce type de traitement par rapport aux tumeurs froides dont le ciblage par immunothérapie semble plus complexe⁸⁴. En revanche, chez les patients présentant des profils tumoraux capables de répondre à l'immunothérapie et recevant ces traitements, seulement une partie d'entre eux en retire un bénéfice clinique. Les enjeux aujourd'hui sont d'optimiser les traitements existants qui ont largement fait leur preuve en clinique et de mettre en place de nouvelles approches et combinaisons afin d'augmenter le nombre de patients répondeurs à l'immunothérapie.

1. Anticorps monoclonaux, modulateurs du système immunitaire et virus oncolytiques

1.1 Anticorps monoclonaux

Les AcM sont dirigés contre un motif peptidique d'un Ag tumoral. Ils se fixent sur les cellules cancéreuses qui surexpriment cet Ag et qui sont alors éliminées par les cellules du SI comme les macrophages et NK exprimant un récepteur (FcR) qui se lie à la partie constante de l'Ac. Ils peuvent également bloquer simplement l'activité de l'Ag cible sans nécessairement conduire à l'élimination directe de la cellule tumorale par des cellules de l'immunité. Les AcM représentent un sous-type de thérapie ciblée puisqu'ils interagissent avec des cibles spécifiques. Les AcM les plus utilisés en clinique sont les anti-CD20 pour certaines hémopathies malignes et les anti-HER2 pour le cancer du sein surexprimant l'Ag. D'autres AcM thérapeutiques ont été approuvés en oncologie, ils ciblent par exemple : CD52 (Alemtuzumab), EGFR (Cetuximab, Panitumumab), VEGFA (Bevacizumab)⁵⁸¹. D'autres approches thérapeutiques combinent des Ac avec d'autres agents anti-tumoraux (AcM conjugués) ou génèrent des Ac à double spécificité (Ac bispécifiques).

Anti-CD20

Le CD20 est un canal calcique transmembranaire impliqué dans l'activation, la prolifération et la différenciation des LB⁵⁸². Les AcM anti-CD20 sont utilisés pour obtenir une déplétion des LB lorsqu'ils présentent des troubles prolifératifs, notamment dans le lymphome non hodgkinien (LNH) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les AcM anti-CD20 ont ensuite été utilisés dans le traitement des maladies auto-immunes. Le premier AcM anti-CD20 thérapeutique généré en 1998, le rituximab, est un chimère murin/humain qui a prouvé son efficacité dans le LNH⁵⁸³. Cependant, de nombreux patients développent des Ac et/ou ont des réactions liées à la perfusion. Ceci a amené à l'apparition d'une seconde génération d'AcM, conçus pour être plus efficaces, mieux tolérés et moins immunogènes. Il s'agit notamment des versions humanisées : ocrelizumab, obinutuzumab et veltuzumab, et de l'ofatumumab, entièrement humain⁵⁸⁴. L'administration d'AcM anti-CD20 épuise presque complètement les LB périphériques, mais les niveaux d'Ac produits par les plasmocytes ne sont pas réduits de façon spectaculaire⁵⁸⁵. Cela suggère que les

bénéfices cliniques de ce type de thérapie, observés chez les patients atteints de maladies auto-immunes, peuvent provenir de la perte d'autres fonctions des LB, telles que la présentation de l'Ag, la production de cytokines inflammatoires, l'activation des LT et la création de follicules lymphoïdes ectopiques⁵⁸⁶. Les effets secondaires connus de ces traitements sont des réactions cutanées au niveau de la zone de perfusion et des états grippaux.

Anti-HER2

HER2 ou ERBB2 fait partie de la famille des 4 récepteurs ERBB présents à la surface des cellules. Il lie les facteurs de croissance solubles et activent la prolifération cellulaire⁵⁸⁷. Sa surexpression et son amplification ont été identifiées dans divers types de cancer et sont associées à un mauvais pronostic⁵⁸⁸. En effet, la surexpression de HER2 entraîne une transformation maligne, le développement de propriétés anti-apoptotiques, une augmentation de l'invasion métastatique et des résistances aux traitements anti-cancéreux^{589,590}. L'AcM anti-HER2 ou trastuzumab (Herceptin®) a été la première thérapie ciblée mise sur le marché en 1998 pour le cancer du sein HER2⁵⁹¹. Son principal mécanisme d'action est le blocage de l'activité oncogénique du récepteur HER2. Il a représenté un succès dans l'amélioration de la survie et de la qualité de vie des patients dans le cas de cancers du sein mais également pour des tumeurs gastriques, pulmonaires, colorectales et gynécologiques⁵⁸⁸. Cependant, la résistance au trastuzumab en monothérapie se produit dans 70% des cancers du sein HER2⁵⁹². Plusieurs mécanismes de résistance ont été identifiés. Des études récentes ont tenté de surmonter cette résistance en ciblant différents domaines du HER2, en développant de petites molécules pour cibler le HER2 et en utilisant des drogues conjuguées aux AcM. Par exemple, de nouveaux agents, tels que le T-DM1 (Ado-transtuzumab emtansine), ont connu un succès remarquable⁵⁹³. Des essais cliniques chez des patients présentant des résistances aux anti-HER2, ont combiné des inhibiteurs de PD-1 avec le trastuzumab ou le T-DM1 et ont montré une efficacité améliorée de ces traitements⁵⁹⁴.

AcM monoclonaux conjugués

Les AcM conjugués sont associés à un médicament de chimiothérapie ou à une particule radioactive. Ces AcM sont utilisés comme dispositif de guidage pour amener l'une de ces substances directement aux cellules cancéreuses. L'Ibritumomab tiuxétan

(Zevalin) est un exemple d'un AcM radiomarqué⁵⁹⁵. Il est composé du rituximab et d'une substance radioactive (Yttrium-90). Le traitement par ce type d'AcM est parfois appelé radio-immunothérapie. Le T-DM1, cité plus haut, est un exemple d'Ac lié à une drogue chimiothérapeutique.

Ac bispécifiques

L'objectif de ces Ac qui ont une double spécificité est d'induire une immunité anti-tumorale supérieure à celle des Ac monospécifiques dirigés contre les mêmes cibles. Ils permettent de rapprocher deux cellules cibles ou d'inhiber deux RI. Il existe trois classes d'Ac bispécifiques⁵⁹⁶. La première engage un Ag tumoral et le CD3 présent sur les LT, elle permet de rediriger les CTL vers les cellules tumorales⁵⁹⁷. C'est la classe d'Ac bispécifiques la plus établie, avec deux composés (Blinatumomab, Catumaxomab) ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et de nombreux composés en développement clinique. Le concept repose sur le fait que l'Ac active les LT par l'intermédiaire de CD3, et dirige ces LT vers la zone de la tumeur grâce à la propriété de liaison de l'Ag tumoral. Un inconvénient évident de cette approche est que le domaine spécifique du CD3 va recruter les LT sans discrimination. Les Ac de deuxième classe se lient à un Ag tumoral et à un récepteur immunomodulateur, comme le CD40 ou le 4-1BB. Enfin, les Ac immunomodulateurs doubles sont des composés bispécifiques qui se lient à deux RI distincts, combinant souvent le ciblage de PD-1 ou PD-L1 avec celui de LAG-3 ou TIM-3.

1.2 Modulateurs du système immunitaire

Ces agents stimulent le SI de manière non spécifique. Parmi eux, les cytokines (IFN, TNF, IL) sont les mieux étudiées. En effet, ce sont des petites molécules qui permettent aux cellules du SI de communiquer afin de générer une réponse coordonnée et efficace à un Ag cible. Au cours des dernières années, des études ont permis d'exploiter leurs vastes réseaux de signalisation pour développer des traitements contre le cancer. L'IL-2 est un facteur de croissance des LT, LB et NK. Elle est utilisée dans le traitement de plusieurs cancers pour stimuler la prolifération et l'activité des LT et NK facilitant ainsi la régression tumorale⁵⁹⁸. Cependant de nombreux effets secondaires ont été reportés. L'IL-2 peut être utilisée seule ou en combinaison avec la chimiothérapie ou d'autres cytokines comme l'IFN- α . On retrouve également les

facteurs de croissance hématopoïétiques qui peuvent être utilisés pour renouveler les cellules immunes, plaquettes et hématies endommagées par les traitements anti-cancéreux (Erythropoietin, IL-11, GM-CSF), le BCG, les ligands de TLR et les drogues qui stimulent le SI en déclenchant par exemple la sécrétion d'IL-2 (Thalidomide, Lenalidomide).

1.3 Virus oncolytiques

L'immunothérapie par les virus oncolytiques (VO) implique l'injection d'un virus au site de la tumeur, où il peut infecter et tuer les cellules tumorales (oncolyse) et les cellules endothéliales vasculaires, entraînant une réaction inflammatoire et une immunosuppression locale réduite⁵⁹⁹. Les Ag tumoraux libérés par l'oncolyse peuvent être pris en charge par les DC qui activent ensuite les LT spécifiques de la tumeur. D'autre part, l'utilisation de VO sous forme de « vaccin », conserve les fonctions d'un VO standard au site de la tumeur, mais sont conçus pour assurer l'induction d'une immunité anti-tumorale. En effet, l'administration systémique conduit au chargement antigénique des DC distales et à l'amorçage de LT spécifiques à la tumeur. Le premier produit viral à avoir reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) est le talimogène laherparepvec (T-VEC) qui dérive du virus de l'herpès simplex 1, avec une insertion du gène codant pour le GM-CSF humain^{600,601}. En 2015, le T-VEC a démontré une induction de réponses anti-tumorales durables chez les patients atteints de mélanome⁶⁰². Dans cette étude, plus de 400 patients ont été traités soit par le T-VEC *in situ*, soit avec du GM-CSF sous-cutané. Les réponses cliniques et la survie globale étaient plus élevées dans le bras T-VEC par rapport au bras GM-CSF. Les autres agents les plus avancés dans le développement clinique sont : le pexastimogène devacirepvec (Pexa-Vec) pour le carcinome hépatocellulaire et pelareorep (Reolysin) en combinaison avec de la chimiothérapie dans les cancers des VADS. Par la suite, dans des modèles précliniques, de nombreuses cytokines ont été exprimées à partir des VO dans le but de stimuler, activer et recruter les LT, NK et DC⁵⁹⁹. Cependant aucun n'a montré d'efficacité significative à ce jour. Les combinaisons de l'immunothérapie par VO, qui entraîne une inflammation des tumeurs, avec les thérapies qui stimulent les réponses anti-tumorales spécifiques comme les vaccins anti-cancer, les inhibiteurs des PCI ou le transfert adoptif de LT, sont actuellement testées en clinique afin de potentialiser leurs efficacités^{603,604}.

2. Vaccins anti-cancer

Les vaccins anti-cancer peuvent être prophylactiques des infections par des virus oncogènes et donc, indirectement, du cancer, comme le vaccin HBV pour lutter contre l'hépatocarcinome et le vaccin HPV (Gardasil®) pour prévenir l'apparition du cancer du col de l'utérus. Les vaccins anti-cancer thérapeutiques pour leur part, sont administrés après le diagnostic dans le but d'induire, d'amplifier ou d'augmenter la diversité d'une réponse immunitaire efficace capable d'éliminer la tumeur existante et de prévenir la rechute. Contrairement aux vaccins préventifs « classiques » contre les maladies infectieuses où la protection est principalement due aux réponses Ac, l'efficacité de la réponse anti-tumorale vaccinale est fortement dépendante des réponses lymphocytaires T spécifiques⁶⁰⁵. Pour induire cette réponse spécifique, les vaccins thérapeutiques anti-cancer stimulent les LT en déclenchant les 3 signaux d'activation, par l'intermédiaire de l'Ag tumoral (signal 1) et des adjuvants qui permettent d'activer les DC qui apporteront les signaux 2 et 3. Il y a quatre composants clefs dans un vaccin anti-cancer : les Ag tumoraux, la formulation, les adjuvants (agonistes de TLR, GM-CSF) et les moyens de délivrance (émulsions, liposomes) (Figure 29). Les deux grandes catégories de formulation sont : celle qui comporte tous les Ag cibles de la tumeur (cellules tumorales entières) et celle qui se concentre uniquement sur les Ag spécifiques de la tumeur.

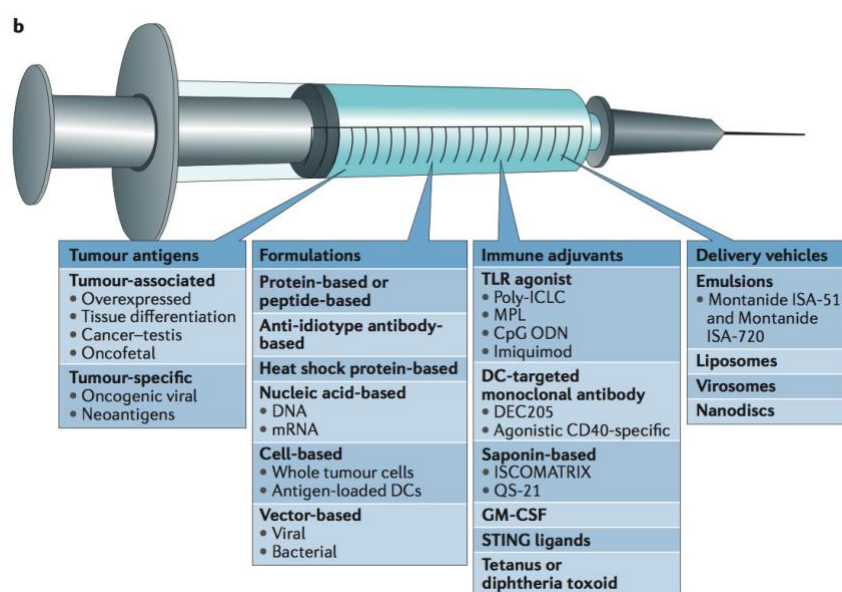


Figure 29 : Composés d'un vaccin anti-cancer (Hu *et al.*, Nature Review Immunology, 2018)⁶⁰⁶.

2.1 Formulés avec des cellules tumorales

Les vaccins basés sur les cellules tumorales entières sont générés soit à partir de tissus tumoraux autologues et contiennent des cellules intactes irradiées⁶⁰⁷ ou des lysats tumoraux, soit à partir de lignées tumorales allogéniques⁶⁰⁸. Les cellules tumorales peuvent être manipulées *in vitro* afin de stimuler efficacement les DC après leur injection chez le patient. Le vaccin GVAX comprend des cellules tumorales provenant de lignées allogéniques irradiées qui sécrètent du GM-CSF recombinant. Celui-ci a le triple rôle d'attirer les DC immatures, d'induire leur maturation et d'activer la présentation croisée de protéines tumorales issues de l'apoptose survenue par la vaccination⁶⁰⁹. Les essais cliniques de phase I/II dans le cancer de la prostate métastatique ont démontré une immunogénicité et une augmentation de la survie pour les patients ayant reçu le GVAX⁶¹⁰. En 2015, GVAX est administré avec le cyclophosphamide, un agent alkylant et la *Listeria monocytogenes* vivante atténuée et modifiée pour exprimer la mésothéline, un Ag tumoral retrouvé dans l'adénocarcinome pancréatique. Cette combinaison induit une immunité innée et adaptative et une meilleure survie chez les patients atteints de cancer du pancréas⁶¹¹. L'utilisation de cellules tumorales autologues irradiées additionnées d'une sécrétion abondante de GM-CSF par des cellules « bystander » induit des réponses immunes réactives à la tumeur et améliore les réponses cliniques de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques qui ont reçu une transplantation de cellules souches hématopoïétiques⁶¹². D'autre part, des vaccins hybrides peuvent être générés par la fusion de cellules tumorales et DC, ce qui permet l'activation de la machinerie de présentation des DC et l'accessibilité à une source continue d'Ag tumoraux⁶¹³. Cette approche a prouvé son efficacité chez des patients atteints de LAM⁶¹⁴. L'administration de l'entièreté des protéines de la tumeur présente des inconvénients puisque la majorité des protéines dans une cellule tumorale sont des protéines normales du soi. De plus, les cellules autologues sont souvent en quantité insuffisante, les lignées allogéniques ne présentent pas forcément le profil antigénique de la tumeur à traiter et les signaux de danger apportés sont généralement insuffisants.

2.2 Formulés avec des antigènes tumoraux

Formulation avec DC

En 2010, le premier vaccin anti-cancer thérapeutique approuvé par la FDA est Sipuleucel-T (Provenge®) pour le cancer de la prostate. Il est constitué de DC autologues pré-incubées avec une protéine de fusion qui lie la phosphatase acide prostatique et le GM-CSF⁶¹⁵. Diverses stratégies ont été développées pour charger efficacement les Ag tumoraux sur les DC⁶¹⁶. Pour ces vaccins générés *ex vivo*, les DC sont d'abord différenciées et activées par des cytokines, puis chargées d'Ag. Des essais cliniques utilisant cette approche ont été effectués sur de multiples tumeurs malignes⁶¹⁷.

Virus recombinants

Une autre stratégie pour délivrer des Ag *in vivo* consiste à utiliser des vecteurs viraux recombinants. Du fait de la forte immunogénicité intrinsèque du vecteur viral, le vaccin peut être éliminé trop rapidement lors des rappels, pourtant nécessaires à l'induction d'une réponse T spécifique de l'Ag tumoral efficace. Cette difficulté a été surmontée par l'utilisation d'une approche dite « heterologous prime-boost » où le cDNA codant pour un même Ag tumoral est inséré dans deux virus différents administrés par alternance. Le vaccin ProstateVax[®] contre le cancer de la prostate consiste en un vecteur recombinant du virus de la vaccine comme vaccin d'amorçage, suivi de rappels contenant un vecteur recombinant de la variole aviaire. Les deux vecteurs viraux qui contiennent des transgènes codant pour le PSA et trois molécules immunitaires co-stimulatrices (CD80, ICAM-1 et LFA-3) ont induit des réponses immunitaires cellulaires et une meilleure survie dans des études de phase II⁶¹⁸. Une autre étude utilisant des vecteurs viraux exprimant l'Ag NY-ESO-1 a démontré leur efficacité dans le cancer de l'ovaire et le mélanome⁶¹⁹.

Acides nucléiques

Les vaccins à base d'ADN et d'ARNm codent pour des Ag tumoraux après administration chez le patient. Les vaccins plasmides à ADN ont été évalués dans plusieurs types de cancer⁶²⁰, néanmoins, l'immunogénicité et l'activité clinique ont jusqu'à présent été modestes. La vaccination basée sur l'ARNm combine un excellent profil de sûreté, une flexibilité et une capacité adjuvante en se liant à un récepteur

TLR⁶²¹. L'injection intradermique d'un vaccin à base d'ARNm codant pour plusieurs Ag tumoraux dans le carcinome rénal a entraîné des réponses T anti-tumorales dans un essai de phase I/II⁶²². La vaccination intra-LN avec un vaccin personnalisé à base d'ARNm codant pour plusieurs néoAg peut susciter une puissante immunité anti-tumorale contre ces néoAg chez les patients atteints d'un mélanome⁶²³.

Peptides antigéniques

Il a été montré que les patients atteints d'un mélanome avancé traités par de l'IL-2 et un vaccin contenant le peptide gp100, ont une meilleure survie globale que les patients traités par IL-2 seule⁶²⁴. Cependant, les vaccins multi-peptides ont montré une efficacité supérieure par rapport aux formulations mono-peptides, car ils sont moins susceptibles de déclencher une tolérance. En outre, les peptides longs (20-30 mers), plutôt que les courts (8-10 mers), sont préférentiellement utilisés car ils doivent être internalisés et apprêtés par des CPA professionnelles pour être présentés, ce qui permet une activation des LT CD4 et CD8⁶²⁵. La présentation par des CPA et l'aide des CD4 améliorent l'induction de la réponse LT CD8 souhaitée. L'efficacité des vaccins peptidiques dépend également des adjuvants co-injectés. Le premier vaccin peptidique constitué de peptides longs dérivés de HPV16, émulsionné avec du Montanide™, a montré des bénéfices cliniques chez des patientes atteintes d'un adénocarcinome vulvaire pré-cancéreux¹⁸³. IMA901 est un vaccin thérapeutique contre le cancer du rein, constitué de multiples peptides tumoraux. En essai de phase II, il est administré avec le cyclophosphamide et est associé à une meilleure survie⁶²⁶. De plus, l'injection de peptides longs chevauchants correspondants à la séquence de l'Ag NY-ESO-1, induit des réponses immunes spécifiques chez des patientes atteintes de cancer ovarien, surtout lorsque deux adjuvants sont associés au vaccin, le Montanide™ et le Poly-ICLC⁶²⁷.

Vaccins personnalisés basés sur les néoAg

Il a été démontré qu'une charge élevée de néoAg chez les patients cancéreux est associée à des réponses lymphocytaires augmentées⁶²⁸ ainsi qu'à de meilleures réponses cliniques aux inhibiteurs de PCI¹⁷⁴. De plus, les populations de LT spécifiques des néoAg sont en expansion lors d'une réponse anti-tumorale efficace⁶²⁹. Ces découvertes ainsi que l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales entre les individus mais également au sein d'un même patient, suggèrent que les vaccins anti-

cancers pourraient être améliorés avec une approche personnalisée basée sur l'utilisation de multiples néoAg qui présentent une très haute spécificité tumorale. L'identification de ces néoAg est de plus en plus perfectionnée avec le séquençage d'ADN et d'ARN de nouvelle génération et les nouveaux outils bioinformatiques⁶³⁰. Les premiers vaccins basés sur des neoAg ont montré des activités anti-tumorales dans des modèles précliniques et ont été testés dans des essais de phase précoce dans le mélanome. Ces vaccins sont basés sur l'injection de DC pulsés avec des neoAg après immunothérapie⁶³¹, une combinaison de 20 longs peptides spécifiques à chaque patients additionnés de poly-ICLC⁶³² ou l'administration d'ARNm codant pour deux Ag partagés (NY-ESO-1 et tyrosinase) suivie de plusieurs injections d'ARNm codant pour 10 neoAg personnalisés⁶²³. Ces trois études valident l'utilisation des vaccins néoAg personnalisés et montrent qu'ils induisent de nouvelles réponses lymphocytaires spécifiques des neoAg robustes chez tous les patients vaccinés. Les essais cliniques basés sur ces vaccins personnalisés sont en expansion dans plusieurs types tumoraux, ils utilisent divers adjuvants et méthodes de délivrance⁶³³. Cependant, comme les conditions de fabrication et d'identification des Ag sont fastidieuses, ces vaccins sont testés dans des petites cohortes de patients et leur bénéfice thérapeutique est à ce jour encore modeste. Les perspectives d'optimisation de ces vaccins consistent à améliorer la prédiction des néoAg, la fabrication des vaccins, le développement des modèles précliniques et la combinaison de thérapies notamment avec les inhibiteurs de PCI⁶³⁴.

3. Transfert adoptif de lymphocytes T

Au début des années 1990, le groupe de S.A Rosenberg utilise une nouvelle approche basée sur le transfert adoptif de TIL, puis plus tard de LT spécifiques d'Ag tumoraux, autologues pour amplifier l'immunité anti-tumorale chez les patients. Cette stratégie utilise des TIL qui ont subi une expansion *ex vivo* ou des LT génétiquement modifiés pour exprimer des TCR transgéniques (Figure 30 a,c) ou des CAR (Chimeric Antigen Receptor) (Figure 30 b) afin de leur conférer une spécificité tumorale.

3.1 TIL

L'immunothérapie basée sur le transfert adoptif de LT spécifiques de la tumeur a d'abord été validée dans des modèles murins il y a plusieurs décennies⁶³⁵. Chez

l'homme, les TIL autologues sont isolés et multipliés *ex vivo* en présence d'IL-2, leur réactivité tumorale est testée et les TIL spécifiques de la tumeur sont sélectionnés pour être réinjectés au patient. Afin d'augmenter l'activité des LT transférés et d'éliminer les cellules immunes immunosuppressives, l'ablation des lymphocytes ou du SI par respectivement, la chimiothérapie ou la radiothérapie systémique, est réalisée avant le transfert adoptif et est associée à une persistance des LT transférés⁶³⁶. Le transfert adoptif est généralement combiné à une injection d'IL-2 et a conduit à des réponses complètes durables chez les patients atteints de mélanome métastatique^{637–639}. Une étude a montré l'efficacité du transfert adoptif de TIL spécifiques de HPV16 dans le cancer du col de l'utérus⁶⁴⁰. Toutefois, cette approche a des limites, car elle est seulement administrée aux patients présentant un état général capable de supporter la lymphodéplétion et l'injection d'IL-2. De plus, la plupart des réponses observées étaient retrouvées dans le mélanome métastatique.

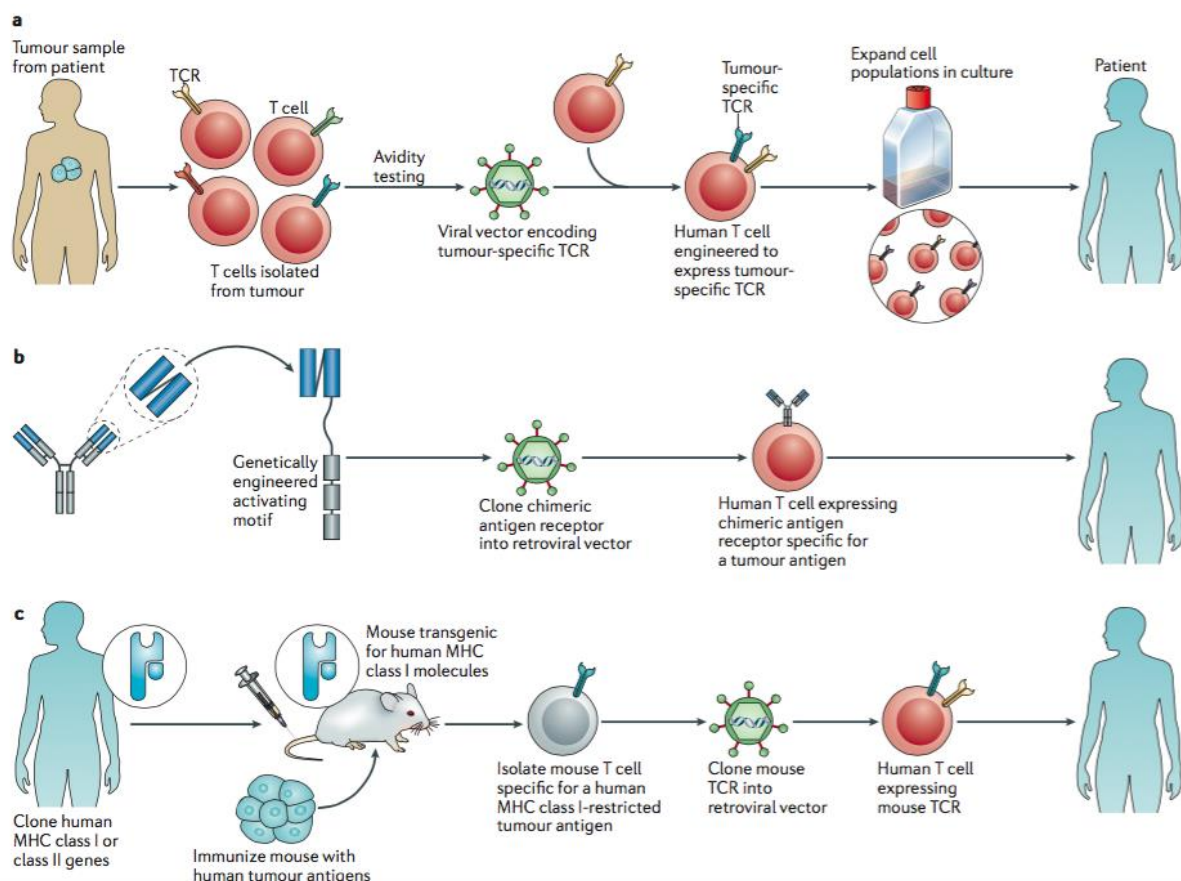


Figure 30: Trois moyens de modifier génétiquement des LT afin de leur conférer une spécificité pour les Ag tumoraux (Restifo *et al.*, Nature Review Immunology, 2012)⁶⁴¹.

3.2 TCR transgénique

Cette méthode permet de transduire des LT autologues avec des vecteurs viraux codant pour un TCR préalablement identifié comme ayant une haute affinité pour un épitope tumoral donné et de les réinjecter au patient. Des LT CD8 circulants ont été transduits avec des rétrovirus codant pour les chaînes α et β de TCR restreints par HLA (Human Leukocyte Antigen)-A2 et spécifiques de peptides dérivés de MART-1, gp100, NY-ESO-1 et p53 puis injectés chez les patients. Un an après la perfusion, ces LT modifiés perdurent et des régressions tumorales sont observées chez deux patients atteints de mélanome sur quinze⁶⁴². Une autre étude utilisant des LT modifiés pour exprimer un TCR spécifique de NY-ESO-1, montre des réponses cliniques chez des patients atteints de sarcome ou mélanome¹⁶². Cette étude montre pour la première fois des réponses cliniques d'un traitement utilisant des TCR transgéniques dans des tumeurs autres que le mélanome. La modification génétique des LT peut également être utilisée pour insérer des gènes qui codent pour des molécules impliquées dans la co-stimulation, la prévention de l'apoptose, l'induction de l'inflammation, ainsi que ceux codant les récepteurs de chimiokines⁶⁴¹. Une étude récente utilise la technologie d'édition du génome CRISPR-Cas9 pour déléter les gènes codant les chaînes α et β du TCR et le PCI PD-1 de LT de patients qui sont ensuite transduits avec un vecteur viral codant pour un TCR spécifique de NY-ESO-1. Les LT modifiées et réinjectées aux patients dans un essai de phase I ont persisté jusqu'à 9 mois. Ceci suggère que l'immunogénicité est minimale et démontre la faisabilité de l'édition du génome par CRISPR pour l'immunothérapie du cancer par transfert adoptif⁶⁴³.

3.3 CAR T cell

Un autre moyen de conférer une spécificité tumorale aux LT est l'utilisation de récepteurs CAR fabriqués *in vitro*. Les CAR sont composés de 4 parties : un domaine de liaison à l'Ag provenant d'un Ac, une charnière, un domaine transmembranaire et un domaine de signalisation intracellulaire. Ils sont synthétisés à partir d'une séquence de gène codant pour des chaînes uniques de régions variables (scFv) d'Ac spécifiques d'un Ag tumoral, fusionnée à des séquences codant des domaines intracellulaires des molécules du complexe TCR⁶⁴¹. Ainsi, des rétrovirus peuvent être utilisés pour transduire des LT avec le CAR qui reconnaît des Ag à la surface des cellules cibles. L'objectif étant d'utiliser les fonctions effectrices des LT tout en contournant le

problème de restriction du TCR par le CMH. Les CAR de 1^{ère} génération permettent une simple activation de la signalisation du complexe TCR. Leur domaine intracellulaire contient la sous-unité CD3 ζ , une composante de la transduction du signal par le complexe TCR qui enclenche l'activation et la cytotoxicité du LT transduit. Cependant, des faibles réponses cytokines par ces LT sont retrouvées. Par la suite, plusieurs autres générations de CAR ont été mises au point⁶⁴⁴ (Figure 31).

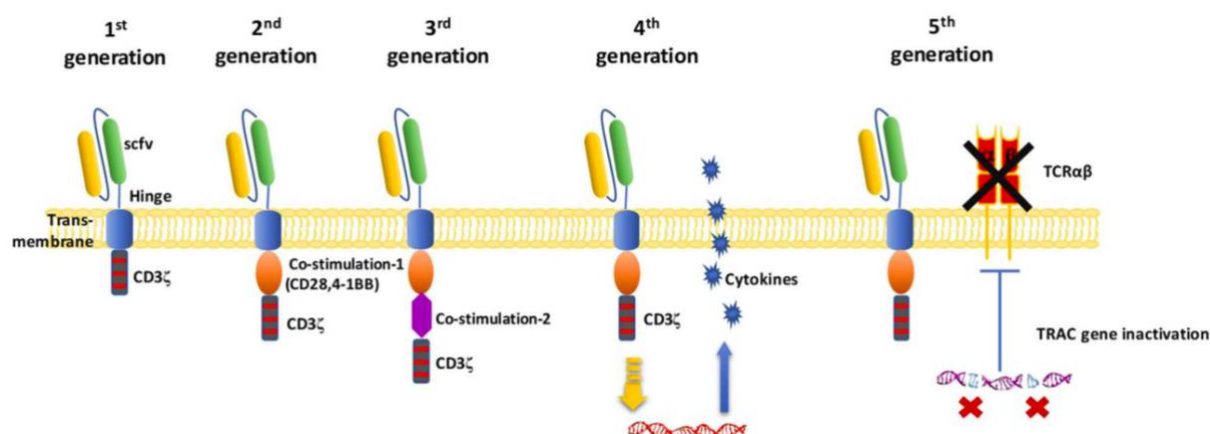


Figure 31 : Structure des CAR (Zhao et Cao, *Frontiers in Immunology*, 2019)⁶⁴⁴.

Les CAR de 2^{ème} génération contiennent le domaine variable d'Ac, la CD3 ζ et en supplément le domaine intracellulaire d'une molécule de co-stimulation afin d'augmenter la force du signal pour une meilleure activation du LT. Deux études ont marqué le succès des CAR de 2^{ème} génération. En 2011, C. June et son groupe ont mis au point un CAR avec une spécificité pour l'Ag CD19 des LB, qui contient dans son domaine intracellulaire : CD3 ζ et le signal de co-stimulation CD137⁶⁴⁵. Les LT autologues qui expriment ce CAR ont été réinjectés à un patient atteint de leucémie chronique lymphoïde et ont persisté à des niveaux élevés pendant 6 mois dans le sang et la moelle osseuse du patient. Une réponse immunitaire spécifique a été détectée dans la moelle osseuse, accompagnée d'une perte de LB sains et leucémiques qui expriment le CD19. Une rémission complète était détectée 10 mois après le traitement. Cependant, le patient présentait plusieurs toxicités dont une lymphopénie. Une autre étude utilise un CAR avec la même spécificité CD19, couplé au CD3 ζ et au domaine de co-stimulation de CD28⁶⁴⁶. Les LT CAR⁺ administrés à des patients présentant des tumeurs malignes issues de la lignée B s'accumulent dans les LN drainant la tumeur et une disparition transitoire de LB CD19⁺ circulants est observée. Sur 15 patients traités, des rémissions complètes (8 patients dont 4 sont réfractaires à la

chimiothérapie) ou partielles (2 patients) ont été retrouvées. Les CAR de 3^{ème} génération contiennent des domaines de signalisation intracellulaires de 2 molécules de co-stimulation différentes. Ceux de 4^{ème} génération peuvent activer le facteur de transcription en aval NFAT capable d'induire la production de cytokines (IL-12, l'IL-15 et l'IL-7) qui augmentent considérablement l'expansion des LT. La 5^{ème} génération de CAR utilise l'édition de gènes pour inactiver l'expression du CMH et du gène TRAC entraînant l'élimination des chaînes α et β du TCR endogène. Cette approche permet d'utiliser des LT provenant de donneurs sains allogéniques tout en évitant la maladie du greffon contre l'hôte. De plus, elle peut être utilisée pour le traitement de plusieurs patients à partir d'un même individu⁶⁴⁷. L'évolution des différentes générations concerne également la méthode de transduction utilisée (lentivirus ou retrovirus) et le mode de transfusion des LT (intraveineuse, péritonéale ou intratumorale).

L'efficacité clinique la plus prometteuse est retrouvée avec l'utilisation de CAR spécifiques de l'Ag CD19. Lors d'essais cliniques basés sur les CAR de 2^{ème} génération spécifiques de CD19, le tisagenlecleucel (Kymriah, CTL019) a été efficace chez 52 des 63 patients inclus et $\frac{3}{4}$ des patients n'ont pas rechuté après 6 mois⁶⁴⁸. D'autre part, l'axicabtagene ciloleucel (Yescarta, KET-C10) a montré des bénéfices cliniques chez 82% des patients dont plus de la moitié étaient en rémission complète⁶⁴⁹. En 2017, la FDA a approuvé ces deux thérapies qui ont montré des avantages à long terme pour le traitement de tumeurs hématologiques^{650,651}. Kymriah est administré dans le cas de leucémie aigüe lymphoïde chez les patients jeunes (< 25 ans) en rechute ou réfractaires aux traitements standards. Yescarta est utilisé pour le traitement des adultes atteints d'un lymphome diffus à grandes cellules B récidivant ou réfractaire. Les principales cibles des CAR testés actuellement en clinique dans les tumeurs hématologiques sont CD19, CD22, CD20, BCMA et Glypican-P3 (GPC3)⁶⁴⁴. Les CAR ont également été testés dans le traitement des tumeurs solides mais présentent une efficacité nettement inférieure notamment à cause du TME immunosuppresseur et de la difficulté d'identifier des Ag tumoraux spécifiques membranaires.

L'utilisation des CAR dans certains types de leucémies et lymphomes a prouvé leur puissante activité thérapeutique. Cependant, leur efficacité est limitée à peu de tumeurs hématologiques et de nombreuses toxicités sont observées. Parmi elles, une oncogénèse par insertion de la séquence codant le CAR dans le génome de la cellule, des allergies, un syndrome de libération de cytokines, des toxicités neurologiques et

la perte des LB normaux. Actuellement, les stratégies de développement des CAR évoluent afin d'augmenter les types tumoraux répondeurs, l'efficacité de ce traitement et de diminuer les toxicités associées⁶⁵².

4. Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire

Dans le but de restaurer les fonctions effectrices des LT chez les patients atteints de cancer, des AcM antagonistes des PCI ou de leurs ligands ont été développés. Des études précliniques ont montré une nette diminution de la croissance tumorale et une amélioration de la survie avec le blocage des RI, ce qui a justifié leur utilisation dans plusieurs essais cliniques. Les inhibiteurs de CTLA-4, PD-1 et PD-L1 sont maintenant approuvés pour le traitement de plusieurs tumeurs malignes. Le succès de ces inhibiteurs et par conséquent, l'expansion des recherches basées sur leur efficacité et mécanisme d'action, ont conduit à une des plus importante avancée dans l'histoire du traitement du cancer. Alors que les patients atteints mélanome et de cancer du poumon en retirent des bénéfices cliniques, d'autres types tumoraux comme le cancer du col de l'utérus ou de l'ovaire sont plus réfractaires à ce traitement. De nouveaux AcM thérapeutiques ciblant d'autres PCI, tels que TIGIT, TIM-3 et LAG-3 sont actuellement en développement. Dans cette partie, nous nous concentrerons particulièrement sur l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1.

4.1 Développement clinique et mécanismes d'action des anticorps bloquant CTLA-4 et PD-1

Parmi les RI des LT, les plus étudiés sont CTLA-4 et PD-1. L'augmentation significative de leur expression par les LT dans la tumeur fourni un rationnel pour l'effet du blocage de ces PCI sur l'augmentation des réponses anti-tumorales effectrices. En effet, leur blocage a démontré une efficacité spectaculaire dans des modèles animaux et dans plusieurs essais cliniques, ce qui a mené à la mise sur le marché de nombreuses molécules dans différentes tumeurs malignes. Plusieurs mécanismes d'action participant à l'efficacité de l'inhibition de ces PCI ont été décrits. L'importance de cette immunothérapie a été reconnue par le prix Nobel de physiologie ou de médecine 2018 décerné pour la découverte de CTLA-4 à J. Allison et de PD-1 à T. Honjo.

Modèles précliniques et essais cliniques

CTLA-4 a été le premier RI ciblé *in vivo* dans un modèle murin. En 1996, J. Allison et ses collaborateurs ont démontré le succès du blocage de CTLA-4 dans la restauration de l'activité anti-tumorale des LT, amenant à l'éradication des tumeurs⁶⁵³. Quelques années plus tard, l'axe PD-1/PD-L1 est à son tour ciblé et prouve également son efficacité dans le contrôle de la progression tumorale chez la souris⁶⁵⁴. En 2010, l'AcM bloquant CTLA-4 (ipilimumab) a été administré chez des patients atteints de mélanome avancé dans deux essais randomisés de phase III^{655,656}. Bien que les taux de réponse soient modestes (10 à 15 %), un avantage significatif en termes de survie a été observé. Dans le premier essai clinique de phase I avec un AcM anti-PD1, des régressions tumorales ont été observées dans quatre des cinq histologies examinées (côlon, rein, poumon et mélanome) qui étaient également associées à une augmentation significative de l'infiltration des LT dans les tumeurs métastatiques⁶⁵⁷. Dans des études cliniques complémentaires, utilisant soit l'AcM anti-PD1⁶⁵⁸ soit l'AcM anti-PD-L1⁶⁵⁹, des réponses cliniques objectives ont été observées chez un grand nombre de patients, en particulier ceux atteints de mélanome, carcinome rénal ou cancer du poumon. Une étude montre que la présence de LT CD8 intra-tumoraux est associée à l'expression de PD-1 et PD-L1 dans la tumeur et peut prédire la réponse au traitement anti-PD-1 (pembrolizumab) de 46 patients atteints de mélanome métastatique³⁴¹. De plus, le blocage de PD-1 montre une meilleure efficacité et des effets indésirables moins importants que lors du blocage de CTLA-4⁶⁶⁰. En 2015, des études de phase III dans le mélanome métastatique⁶⁶¹ et le cancer du poumon⁶⁶² ont démontré une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans progression chez les patients traités avec l'Ac anti-PD-1 (nivolumab) en comparaison avec une chimiothérapie. Des essais plus récents dans le cancer du poumon montrent que le nivolumab en traitement néoadjuvant a été associé à peu d'effets secondaires, a induit une réponse clinique majeure dans 45% des tumeurs réséquées et l'expansion de LT spécifiques de néoAg détectables dans le sang périphérique⁶⁶³. Le blocage de la voie PD-1/PD-L1 a conduit à des réponses cliniques durables chez des patients atteints d'un large spectre de cancers solides et hématologiques avec un profil de toxicité acceptable⁶⁶⁴. Ces résultats soulignent le rôle de l'immunosuppression comme un des principaux obstacles à l'éradication de la tumeur par la réponse immunitaire.

Autorisations de mise sur le marché

Le nombre de types histologiques tumoraux pour lesquels les inhibiteurs de PCI sont approuvés est aujourd'hui en pleine expansion⁶⁶⁵. Depuis l'approbation de l'ipilimumab par la FDA en 2011 pour le mélanome métastatique, six autres Ac bloquants ont été approuvés pour le traitement du cancer, tels que : les inhibiteurs de PD-1 nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab et les inhibiteurs de PD-L1 atézolizumab, avelumab et durvalumab. La chronologie depuis la première administration chez l'Homme jusqu'à l'autorisation de mise sur le marché (approuvée aux Etats-Unis par la FDA) de chaque inhibiteur dans plusieurs types tumoraux est résumée dans la Figure 32. Depuis la publication de ces données en 2018, ces inhibiteurs ont également été approuvés dans de nouvelles indications⁶⁶⁶. De plus, le cemiplimab a été approuvé en 2018 pour le traitement du carcinome épidermoïde cutané métastatique localement avancé lorsque les patients n'ont pas une indication de chirurgie curative ou de radiothérapie⁶⁶⁷. Ces inhibiteurs ont également été approuvés en France mais dans un spectre plus restreint de types tumoraux et dans des lignes de traitement plus avancées.

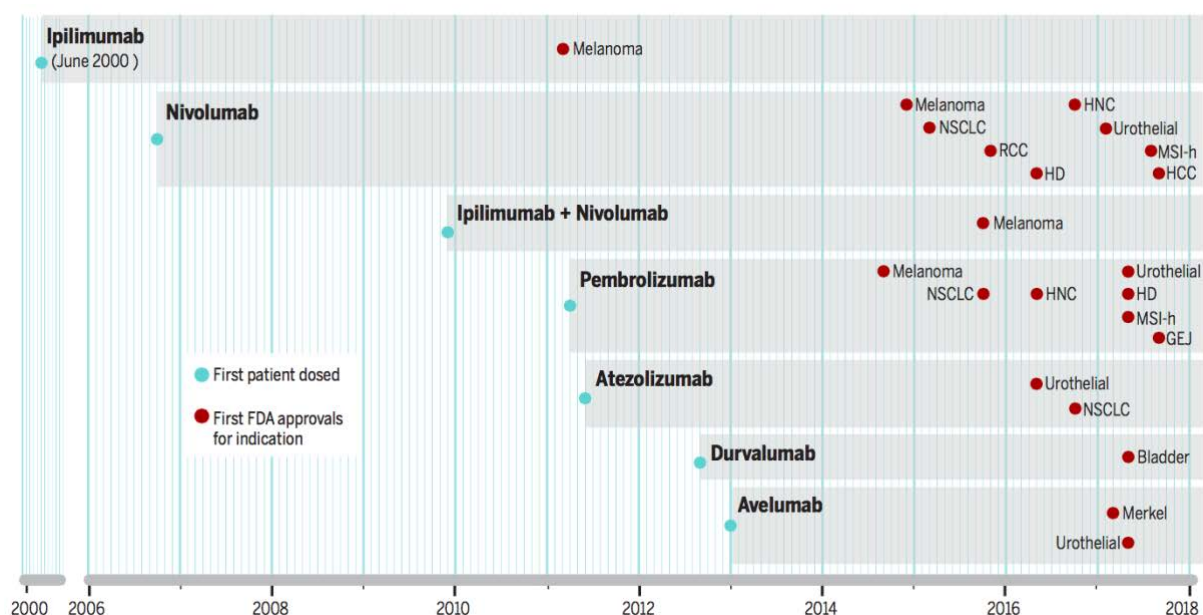


Figure 32 : Chronologie du développement clinique des inhibiteurs de PCI, depuis la première administration chez l'Homme jusqu'à l'approbation par la FDA de chaque inhibiteur dans plusieurs types tumoraux (Ribas and Wolchok *et al.*, Science, 2018)⁶⁶⁸.

Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des inhibiteurs de PCI ne sont pas encore totalement bien compris. D'après la chronologie d'expression de CTLA-4 et PD-1, on pense que le blocage de CTLA-4 agit principalement aux sites d'amorçage alors que le blocage des PD-1 agirait pendant la phase effectrice, dans les tissus périphériques enflammés, tel que la tumeur. Cependant, leurs mécanismes d'action ne se limitent pas à ces seuls sites, ils sont très complexes.

AcM anti-CTLA-4. Ils permettent principalement de restaurer la liaison de la molécule de co-stimulation CD28 avec les ligands CD80/86 des CPA⁶⁶⁹. Ceci entraîne des modifications des gènes associés à la prolifération et au cycle cellulaire des LT et une réponse anti-tumorale. D'autre part, dans des modèles *in vivo*⁶⁷⁰ et *ex vivo*⁶⁷¹, il a été démontré que les Ac bloquants CTLA-4 peuvent inhiber ou dépléter les Treg au site de la tumeur par le phénomène d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'Ac). De plus, les anti-CTLA-4 pourraient réduire la trans-endocytose des molécules CD80/86, engagée par le CTLA-4 exprimé sur les Treg⁶⁷². Le blocage de CTLA-4 peut également contribuer à un remodelage et un élargissement du répertoire TCR⁶⁷³. En effet, il peut laisser agir des Ag à faible intensité de signal qui est normalement insuffisante pour générer une réponse efficace des LT. Comme l'interaction CTLA-4/CD80 entraîne l'expression d'IDO par les CPA, il est supposé que l'inhibition de CTLA-4 bloque ce phénomène⁶⁷⁴. Un autre mécanisme d'action potentiel de l'ipilimumab implique l'induction de l'expression d'ICOS sur les TILs⁶⁷⁵. En effet, il induit l'expansion d'une population de LT CD4 PD-1⁺ICOS⁺T-bet⁺ qui semble correspondre aux Tfh⁶⁷⁶. De plus, il a été montré dans un modèle murin, que le blocage de CTLA-4 entraîne une expansion de LT CD8 spécifiques des néoAg dans le microenvironnement de la tumeur, mais pas dans les LN⁶⁷⁷.

AcM anti-PD-1. Bien que le blocage de PD-1 soit généralement connu pour renforcer l'activité effectrice des LT, il pourrait aussi restaurer l'activité des cellules NK et accroître la production d'Ac, soit indirectement, soit par des effets directs sur les LB PD1⁺, comme décrit dans des infections virales chroniques⁶⁷⁸. Il a été montré que la liaison PD-1/PD-L1 empêche les LT d'entrer dans la tumeur. Le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 permettrait la prolifération et l'infiltration des LT au site tumoral⁶⁶⁸. Des découvertes récentes démontrent que la co-stimulation par CD28 est nécessaire pour

répondre au blocage de PD-1⁴⁸⁷. Cela relève la possibilité que le blocage de PD-1 n'agisse pas seulement dans la tumeur mais aussi dans les sites d'amorçage. Alors qu'il entraîne principalement l'expansion des LT CD8, les LT CD4 sont nécessaires pour des réponses efficaces aux anti-PD-1⁶⁷⁹. De plus, le blocage de l'axe de signalisation de PD-1 est capable d'inverser la reprogrammation métabolique des LT, préalablement associée à l'expression de PD-1⁶⁸⁰.

AcM anti-PD-L1. Ils bloquent les interactions PD-1/PD-L1 et conserve les interactions PD-1/PD-L2. Ceci permet d'induire une toxicité moindre par rapport au blocage de PD-1, puisque la tolérance du soi médiée par les interactions PD-1/PD-L2 est préservée⁶⁸¹. De plus, comme PD-L1 est connu pour lier CD80 à la surface des LT et des DC afin de délivrer un signal négatif, l'inhibition de PD-L1 pourrait empêcher cette régulation négative⁶⁸². Il a récemment été démontré que PD-L1 inhibe l'apoptose des cellules tumorales médiée par l'interféron et STAT3⁶⁸³. Les Ac ciblant PD-L1 pourraient alors lever cette inhibition. Le blocage de PD-L1 peut également tirer une partie de son efficacité de l'ADCC. En effet, il a récemment été démontré dans des modèles murins que la liaison au récepteur FcR est importante pour l'efficacité de la régression tumorale induite par les AcM anti-PD-L1, mais pas par les AcM anti-PD-1⁶⁸⁴.

Combinaison anti-CTLA-4 et anti-PD-1

En 2009, le premier patient a été traité par la combinaison de l'ipilimumab et du nivolumab. Ce traitement a été conçu sur la base des rôles inhibiteurs non redondants des deux voies, après que des études précliniques aient montré des signes de synergie dans des modèles murins⁶⁸⁵. Plus récemment, en utilisant la cytométrie de masse (CyTOF), le laboratoire de J. Allison a montré que le blocage de CTLA-4 et PD-1 utilisent des mécanismes distinct et ciblent des sous-populations différentes de LT épuisés⁶⁷⁶. Le double blocage a conduit à des changements non chevauchants dans l'expression des gènes. L'essai clinique de phase I a été mené chez des patients atteints de mélanome métastatique et a montré un taux de réponses objectives de plus de 50 %⁶⁸⁵. Il est important de noter que les toxicités de haut grade étaient plus élevées par rapport aux essais de monothérapie. Les études de phase II et III ont confirmé un taux de réponse d'environ 60%. En 2015, la combinaison ipilimumab/nivolumab reçoit l'approbation par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique. L'analyse la plus récente a montré que les patients

recevant cette combinaison avaient une survie à 3 ans plus élevée que les patients recevant le nivolumab seul, mais avec une fréquence de toxicité plus élevée⁶⁸⁶. Les essais en cours examinent un schéma de dosage adaptatif avec une évaluation précoce de la réponse afin de réduire la toxicité.

4.2 Inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique

Biomarqueurs

La plupart des données suggèrent qu'une réponse anti-tumorale T préexistante est nécessaire à la réponse clinique au traitement par Ac anti-PD-1/PD-L1⁶⁷⁹. L'expression de PD-L1 au site tumoral a d'abord été associée à une réponse anti-tumorale préexistante, faisant de PD-L1 un biomarqueur intéressant de prédiction de la réponse. Cependant, certains patients qui ne présentaient pas de PD-L1 intra-tumoral répondaient au traitement. A l'inverse, des tumeurs positives pour PD-L1 ne sont pas forcément infiltrées par des LT³³⁹. Ces données montrent la nécessité d'identifier de nouveaux biomarqueurs. D'autres marqueurs ont été investigués, ils comprennent, l'expression de récepteurs, l'activation ou la suppression de certaines voies de signalisation, le nombre et la clonalité des LT, mais aucun n'a été strictement identifié comme prédictif de la réponse⁶⁸⁷. De plus, la charge mutationnelle et l'expression de néoAg ont été corrélés à l'efficacité clinique chez les patients atteints de cancer du poumon traités avec des anti-PD-1⁶²⁹.

Réponses cliniques

Les taux de réponses cliniques du blocage de l'axe PD-1/PD-L1 sont élevés (de 50 à 90%) dans le lymphome de Hodgkin, qui exprime de manière constitutive PD-L1 ; le carcinome cutané à cellules de Merkel ; les cancers à instabilité des microsatellites, qui ont une charge de mutations élevée ; et le mélanome desmoplastique, un sous-type rare de mélanome qui a une charge de mutations induites par les rayons UV très élevée⁶⁶⁸. Les autres types de mélanomes présentent des taux de réponse relativement élevés (de 35 à 40 %). Les cancers associés aux effets carcinogènes du tabagisme, tels que le cancer du poumon et les cancers des VADS ainsi que les cancers gastro-œsophagien, de la vessie et urothéliaux ont des taux de réponse de 15 à 25 %. La plupart des patients qui ont des réponses objectives maintiennent un contrôle durable de la maladie, en revanche, un tiers des patients rechutent.

Effets indésirables

Le blocage de la voie PD-1/PD-L1 peut provoquer une activité immunitaire indésirable ou des réponses auto-immunes. Même si plusieurs épisodes toxiques appelés irAE (immune-related Adverse Events) sont observés, cette immunothérapie présente un profil de toxicité relativement favorable^{660,688}. Très peu de patients (~5 %) interrompent le traitement en raison des toxicités. Les effets indésirables liés au traitement les plus fréquents sont la fatigue, les troubles gastro-intestinaux, les éruptions cutanées et le prurit qui apparaissent chez 15 à 20 % des patients^{661,689}. Chez un plus faible taux de patients, les toxicités sont plus graves et comprennent plusieurs endocrinopathies, entraînant un dysfonctionnement irréversible, comme les troubles thyroïdiens, de l'hypophyse, des glandes surrénales et le diabète de type 1. Généralement, le traitement des toxicités induites par les anti-PCI inclut des corticoïdes, et parfois des anti-TNF⁶⁹⁰.

Résistances

Les tumeurs qui évoluent pour échapper au SI rendent le blocage des PCI inefficace⁶⁹¹. En effet, l'immunoediting du cancer est responsable d'une résistance primaire au blocage de PD-1 ou conduit à une résistance acquise qui se développe pendant le traitement des tumeurs qui ont au préalable présenté une réponse initiale. Cette résistance peut survenir à différentes étapes du cycle de l'immunité du cancer⁶⁹². Les cellules et molécules immunosuppressives du TME, décrites précédemment, participent également à la résistance du blocage de l'axe PD-1/PD-L1.

Résistance primaire. Elle peut être induite par l'expression constitutive de PD-L1 due à des oncogènes⁶⁹³. Par exemple, des études ont mis en évidence une corrélation entre la perte de PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) dans les cellules cancéreuses et l'augmentation de l'expression de PD-L1⁶⁹². PTEN est un suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie PI3K/AKT responsable de la prolifération et de la survie⁶⁹⁴. L'expression d'une signature de gènes associés à la résistance primaire aux anti-PD-1 (IPRES) a récemment été identifiée⁶⁹⁵. Des analyses transcriptomiques de biopsies de patients atteints de mélanome, qui ne répondent pas à une immunothérapie anti-PD-1, montrent un enrichissement de gènes associés à la voie Wnt, à la transition mésenchymateuse, à la cicatrisation et à l'angiogenèse. Ceci

a été observé non seulement dans le mélanome métastatique mais aussi dans d'autres types de cancers. Des études récentes ont mis en évidence le rôle du microbiome intestinal dans la réponse des patients à l'immunothérapie. Le séquençage du microbiome oral et intestinal des patients atteints de mélanome métastatique a révélé une corrélation entre la diversité du microbiome intestinal et la réponse à la monothérapie anti-PD-1⁶⁹⁶.

Résistance acquise. Elle peut être induite par les cellules tumorales qui modifient leur expression génique afin d'échapper à la réponse immunitaires. Par exemple, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales peut être induite, par l'intermédiaire du facteur IRF1, qui se lie à son promoteur, en réponse à l'IFN- γ sécrété par les LT activés⁶⁹⁷. D'autre part, il a été montré dans le cancer de l'ovaire métastatique que le blocage de PD-1 induit l'expression d'autres PCI, limitant son efficacité⁶⁹⁸. Dans une autre étude, une augmentation de l'expression de TIM-3 a été observée chez des patients qui ont développé une résistance acquise à l'immunothérapie anti-PD-1. De plus, le blocage de TIM-3 chez la souris a entraîné une amélioration de la survie, une augmentation de la production d'IFN- γ et de la prolifération des LT CD8⁶⁹⁹. De manière intéressante, une étude a mis en évidence que le blocage du TNF- α prévient l'expression de PD-L1 et TIM-3 ainsi que l'ACID dans les TIL CD8, surmontant ainsi la résistance à l'anti-PD-1 dans le mélanome⁷⁰⁰. Les tumeurs peuvent également acquérir des mutations dans les gènes codant pour les récepteurs de l'IFN- γ ou les molécules impliquées dans la signalisation par ces récepteurs et deviennent ainsi résistantes aux effets de l'IFN- γ ⁷⁰¹. Ce mécanisme a également été décrit dans le cas de résistance primaire à l'immunothérapie⁷⁰².

4.3 Efficacité clinique de l'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 dans les cancers de l'ovaire, du col de l'utérus et des VADS

Cancer de l'ovaire

L'importance du SI dans le cancer de l'ovaire a été démontrée par l'association entre la présence de TIL et un pronostic favorable³⁴⁶. Cependant, les cellules cancéreuses de l'ovaire ont une expression accrue de PD-L1. Différentes approches d'immunothérapie sont en cours de développement dans ce type tumoral, notamment le blocage des PCI⁷⁰³. Des essais cliniques de blocage de l'axe PD-1/PD-L1 en

monothérapie dans de petites cohortes de patientes atteintes de cancer de l'ovaire ont démontré un faible taux de réponse objective (<15%)⁷⁰⁴. Néanmoins, un essai de phase Ib (keynote-028) chez 26 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé PD-L1⁺ montre que le pembrolizumab confère une activité anti-tumorale durable, avec une tolérabilité et une toxicité gérables⁷⁰⁵.

À ce jour, aucun biomarqueur prédictif n'a été identifié dans ces études. Un essai clinique récent de phase II (keynote-100), a examiné l'activité anti-tumorale et l'efficacité du pembrolizumab en monothérapie dans une large population de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avancé⁷⁰⁶. Dans cette étude, le pembrolizumab a montré une activité modeste. Cependant, une expression élevée de PD-L1 était corrélée à une meilleure réponse au traitement. En conclusion, le cancer de l'ovaire semble résistant au blocage des PCI, une analyse approfondie des mécanismes impliqués est nécessaire.

Cancer du col de l'utérus

Étant donné la présence d'Ag tumoraux d'origine virale dans le cancer du col de l'utérus, il est suggéré comme fortement immunogène. L'évaluation de l'inhibition des PCI comme stratégie thérapeutique dans ce contexte a suscité un grand intérêt. De plus, l'expression de PD-L1 est fortement augmentée dans les tissus tumoraux du col de l'utérus par rapport aux tissus sains⁷⁰⁷. Un essai de phase II chez 92 patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus avancé qui reçoivent du pembrolizumab en monothérapie, a démontré une activité anti-tumorale durable et une toxicité gérable avec un taux de réponse global de 14%⁷⁰⁸. Les résultats de cet essai ont permis, en 2018 aux Etats-Unis, l'autorisation de mise sur le marché du pembrolizumab dans le cancer du col de l'utérus PD-L1⁺ récidivant ou métastatique qui progresse après chimiothérapie. En France, l'AMM n'a pas encore été délivrée dans cette indication mais les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 peuvent être administrés dans le cadre d'essais cliniques.

Cancer des VADS

En 2016, le nivolumab et le pembrolizumab ont été approuvés par la FDA pour le traitement des patients atteints d'un carcinome épidermoïde des VADS récidivant ou métastatique, qui ont progressé après un traitement standard à base de sels de platine. En effet, le nivolumab a montré un bénéfice en terme de survie globale dans un essai

de phase III (CheckMate-141)⁷⁰⁹ [42] et le pembrolizumab était associé à une augmentation du taux (16%) et de la durée des réponses cliniques (Keynote-012)⁷¹⁰. En 2019, la FDA a approuvé le pembrolizumab en tant que traitement de première intention pour les patients atteints d'un cancer des VADS métastatique ou non résécable récidivant, en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie à base de platine et de fluorouracile, chez les patients dont la tumeur exprime PD-L1. Ceci était basé sur l'augmentation de la survie globale observée dans l'essai Keynote-048⁷¹¹. Pour les mêmes indications, l'agence européenne des médicaments (EMA) en 2017 et la France en 2018, ont approuvé le nivolumab en 2^{ème} ligne et l'AMM a été obtenue pour le pembrolizumab en 2020 comme traitement de première intention. Comme décrit précédemment, le cancer des VADS induit par le virus HPV est de bon pronostic. De plus, il a été montré que les taux de réponse, après l'administration de pembrolizumab, étaient plus élevés chez les patients HPV⁺ que chez les patients HPV⁻, avec respectivement un taux de réponse de 32 % et 14 %, quel que soit leur statut PD-L1 (KEYNOTE-012)⁷¹². En outre, l'essai de phase II HAWK a examiné l'efficacité du durvalumab seul par rapport à la chimiothérapie, les patients HPV⁺ ont présenté un taux de réponse de 30%, contre 10,8% chez ceux qui étaient HPV⁻⁷¹³.

Les cancers des VADS ont des taux de réponse corrects aux blocages des PCI, qui prennent une place de plus en plus importante dans la prise en charge des patients⁷¹⁴. Même si l'efficacité est nettement supérieure chez les patients HPV⁺, ce critère n'est pas encore pris en compte dans le choix du traitement. Cependant, les irAE propres aux patients atteints de cancer des VADS doivent encore être identifiés et mieux gérés afin d'équilibrer la toxicité immunitaire avec l'efficacité anti-tumorale.

5 Combinaisons impliquant les inhibiteurs de PCI

Malgré le grand succès du blocage des PCI, tous les patients ne répondent pas à ces traitements et chez les répondeurs, des effets secondaires, qui peuvent être sévères, et des rechutes sont observés. C'est pourquoi, il est nécessaire d'améliorer l'efficacité de ces traitements et de surmonter les résistances. Une des stratégies est la combinaison de différents agents thérapeutiques. Actuellement, le développement clinique des agents ciblant PD-1/PD-L1 est à l'épicentre du développement des médicaments en onco-immunologie⁷¹⁵. En effet, la manière dont le blocage des PCI

interagit mécaniquement avec les thérapies conventionnelles et d'autres immunothérapies est un sujet d'une pertinence évidente et fait l'objet d'une recherche active. Bien que seulement deux combinaisons thérapeutiques ont été approuvées par la FDA (nivolumab avec ipilimumab et pembrolizumab avec chimiothérapie), le nombre d'essais cliniques testant les combinaisons avec les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 a plus que triplé au cours des trois dernières années, il est passé de 857 en 2017 à 2 900 en 2020 avec 129 groupes de cibles supplémentaires (Figure 33).

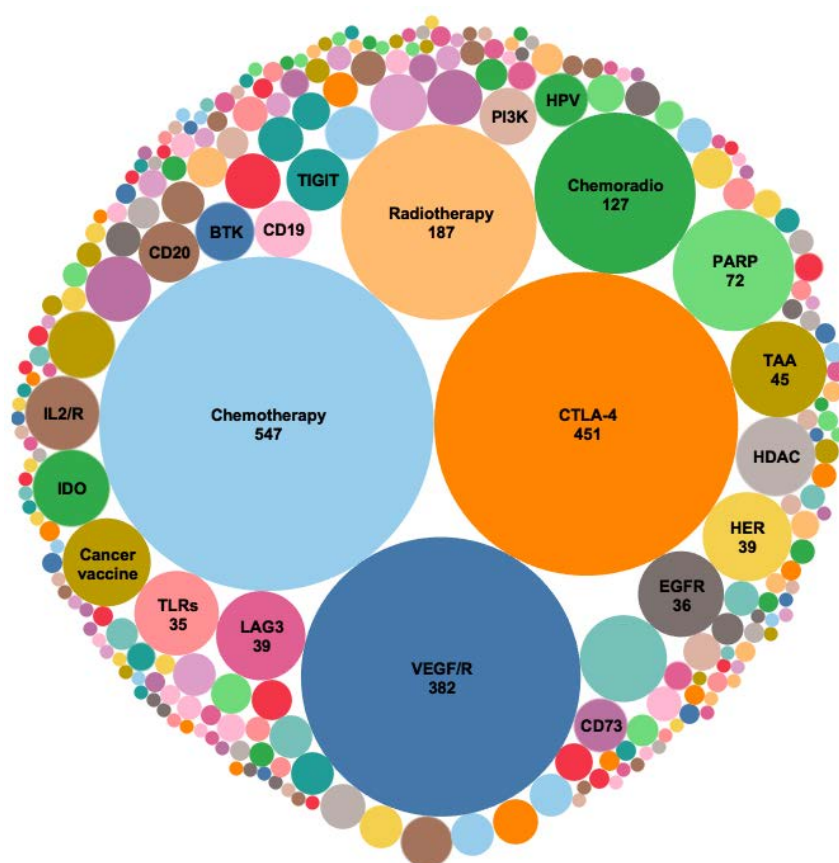


Figure 33: Essais cliniques évaluant le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 en combinaison avec d'autres cibles thérapeutiques en 2020. Les cibles similaires sont regroupées et les nombres des essais en cours sont indiqués (Cancer research institute et clinicaltrials.gov, 2020).

5.1 Plusieurs anticorps ciblant les PCI

Parmi les essais de combinaison, CTLA-4 est une des cibles la plus courante en combinaison avec le blocage de PD1/PDL1. En 2020, 451 essais cliniques sont en cours dans plusieurs indications. TIGIT et PD-1 sont co-exprimés par des LT CD8 spécifiques de NY-ESO-1 infiltrant le mélanome⁴⁹¹, ce qui est en adéquation avec les

résultats précliniques obtenus par un double blocage de ces PCI qui améliore les fonctions effectrices des LT CD8 et le rejet de la tumeur⁴⁹². En clinique, TIGIT est actuellement ciblé dans plusieurs essais en combinaison avec des anti-PD-1/PD-L1, anti-CTLA-4 et anti-LAG3⁴⁹⁰. Les AcM bloquants anti-LAG-3 sont en cours d'essais cliniques pour divers cancers, soit en monothérapie, soit en combinaison, principalement avec les AcM bloquants anti-PD-1 ou anti-PD-L1⁵²¹. Le blocage de TIM3 est actuellement testé dans de nombreux essais de phase I/II en combinaison avec des anti-PD-1 dans plusieurs types de cancers⁵⁰⁸. Les premières données ont montré que cette combinaison est largement bien tolérée et qu'elle permet une réponse clinique chez les patients atteints de cancer du poumon qui avaient progressé lors d'un traitement anti-PD-1 antérieur. Grâce à l'identification de nouvelles cibles immunitaires comme les PCI ; TIGIT, BTLA, VISTA, TIM-3, LAG3 et CD47 et les molécules co-stimulatrices telles que CD137, OX-40 et GITR, le potentiel de l'immunothérapie dans le traitement du cancer s'élargit. Cependant, une compréhension plus approfondie des rôles biologiques fondamentaux de ces molécules est essentielle pour le développement rationnel de nouvelles thérapies de blocage des PCI.

5.2 Combinaison avec les traitements standards

Afin d'améliorer l'efficacité du blocage des PCI, des combinaisons avec la chimiothérapie, la radiothérapie ou les thérapies ciblées ont été envisagées puisqu'elles stimulent le SI en induisant une libération d'Ag et fournissent des signaux de danger. Les combinaisons impliquant les chimiothérapies telles que, paclitaxel, dacarbazine, carboplatin/paclitaxel et carboplatin/gemcitabine, ont une place importante dans les essais avec les anti-PD-1 et anti-CTLA-4. Les premiers résultats encouragent l'optimisation des modèles précliniques représentatifs, des combinaisons de médicaments et des profils de concentration et de chronologie d'administration⁷¹⁶. Les combinaisons avec les thérapies ciblées impliquent les inhibiteurs de BRAF et MEK, EGFR, PARP, mTOR. De plus, les agents anti-angiogéniques ciblant le VEGF ou son récepteur, qui normalisent les vaisseaux intra-tumoraux, sont largement représentés dans les essais de combinaison avec les anti-PD-1/PD-L1. Une étude avec un AcM anti-PD-1 a amélioré le contrôle de la tumeur obtenu avec un AcM anti-VEGF dans différents modèles de cancer⁷¹⁷. Cependant, les effets indésirables sont

souvent sévères lors des combinaisons des anti-PCI avec la chimiothérapie ou les thérapies ciblées.

Le blocage des PCI combiné à la radiothérapie hypofractionnée ou stéréotaxique est une combinaison thérapeutique prometteuse. Il a été démontré que la radiothérapie et le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 ont des effets additifs par des mécanismes non redondants⁷¹⁸. En particulier, des réponses appelées abscopales, qui entraînent une réduction de la tumeur ciblée par la radiothérapie, mais également une réduction des tumeurs non traitées présentes à d'autres sites, ont été observées à la suite d'une irradiation et d'un blocage du CTLA-4, mettant en évidence une efficacité synergique⁷¹⁹. Concernant les mécanismes d'action des réponses abscopales, une étude a montré que l'activation des LT anti-tumoraux favorisée par la radiothérapie et dépendante des interférons de type I⁷²⁰, est essentielle pour obtenir des réponses abscopales dans les modèles murins⁷²¹. Une étude chez des patients atteints de cancer du poumon métastatique, qui est chimiorésistant et ne montre pas de réponse significative au blocage du CTLA-4, montre que la combinaison de la radiothérapie et des anti-CTLA-4 a induit des réponses objectives chez 18 % des patients et 31 % ont montré un contrôle de la maladie⁷²². L'augmentation du taux d'interférons de type I après irradiation et les changements dynamiques des clones de LT circulants sont associés aux réponses cliniques les plus fortes, confirmant les données mécanistiques précliniques. L'analyse fonctionnelle chez un patient répondeur a montré l'expansion rapide *in vivo* des LT CD8 reconnaissant un néoAg codé par un gène régulé à la hausse par les radiations, soutenant l'hypothèse qu'une explication de la réponse abscopale est l'exposition du SI à des mutations immunogènes induites par les radiations. En effet, des données précliniques montrent que la radiothérapie peut convertir la tumeur irradiée en un site d'amorçage des LT spécifiques de la tumeur, c'est-à-dire mimer un vaccin *in situ*⁷²³. Il est proposé que la modulation antigénique des cellules tumorales associée à l'inflammation du TME sont responsables de la synergie entre la radiothérapie et l'immunothérapie⁷²⁴. La présence de mutations immunogènes dans les gènes qui sont régulés à la hausse par les radiations pourrait prédire quels patients peuvent bénéficier d'un traitement combinant radiothérapie et blocage des PCI.

La combinaison avec les agents modifiant l'épigénétique, comme les Inhibiteurs des histones déacetylases (HDAC) ou les agents hypométhylants, a pour but d'augmenter l'infiltration des LT dans la tumeur et la signalisation de l'IFN- γ . Les combinaisons

d'inhibiteurs de HDAC et d'anti-PD-1 ont des effets prometteurs dans des modèles précliniques⁷²⁵.

5.3 Combinaison avec d'autres immunothérapies

Des études suggèrent qu'une régression tumorale complète peut être obtenue après un traitement combiné entre le transfert adoptif de LT et le blocage des PCI⁷²⁶. Cependant, son utilisation est difficilement envisageable en raison des difficultés techniques et des coûts élevés. Les données cliniques indiquent également que la combinaison avec des vaccins anti-cancer est efficace. Un essai clinique récent administrant un vaccin ARN, montre des réponses objectives durables chez les patients atteints d'un mélanome non résecable ayant subi un traitement par un inhibiteur de PCI⁷²⁷. Les réponses cliniques s'accompagnent de l'induction d'une forte réponse immune des LT CD4 et CD8 spécifiques des Ag du vaccin. Plusieurs essais actuels testent la combinaison du blocage PD-1/PD-L1 avec des agents stimulant le SI tels que, les AcM anti-OX-40, anti-CD137, anti-CD40, anti-ICOS, anti-KIR (activation des NK), anti-CD25, anti-TNF, les virus oncolytiques et les agonistes de TLR⁷²⁸. D'autre part, il a été montré que l'inhibition des populations myéloïdes immunosuppressives, par altération de la voie PI3K, en combinaison avec le blocage des PCI permet de surmonter la résistance à l'inhibition des PCI⁷²⁹. Parmi les nouveaux essais de combinaison, les inhibiteurs métaboliques tels que les Inhibiteurs d'IDO ou du récepteur à l'Ado ont été testés en clinique, ils ont pour but d'augmenter l'efficacité destructrice des LT⁷³⁰.

OBJECTIFS

Les LT spécifiques des Ag tumoraux sont capables de contrôler efficacement la croissance tumorale chez les patients. Les LT CD4 soutiennent l'amorçage et la différenciation des LT CD8 qui ont une activité cytotoxique directe contre les cellules tumorales. En revanche, les tumeurs évoluent et mettent en place un microenvironnement immunosuppresseur qui leur est favorable au point d'échapper au SI. Les TIL retrouvés épuisés et dysfonctionnels, sont notamment caractérisés par l'expression de PCI, par exemple PD-1.

L'immunothérapie, qui vise à réactiver l'immunité anti-tumorale, a représenté une des plus importantes avancées dans le domaine du traitement du cancer. La stratégie qui a suscité le plus d'intérêt est le blocage des PCI exprimés par les TIL. Les résultats cliniques fulgurants des AcM bloquant l'axe PD-1/PD-L1 soulignent le rôle de l'immunosuppression, engagée via les PCI, comme principal obstacle pour éradiquer la tumeur. Toutefois, d'autres mécanismes d'inhibition semblent impliqués puisque même chez les individus ayant des LT *in situ*, seulement une proportion des patients répondent à ce traitement. De plus, des mécanismes de résistance sont retrouvés chez les patients qui ont au préalable répondu au traitement.

Chez les patients répondeurs à cette immunothérapie, la réponse est durable, la survie augmentée et la tolérabilité du traitement est acceptable. Afin d'améliorer l'efficacité de cette thérapie prometteuse, il est nécessaire d'investiguer les obstacles présents chez les patients non répondeurs, dans le but de les surmonter et cibler un plus large éventail d'individus. La compréhension des mécanismes de dysfonction des TIL et de l'efficacité des AcM dirigés contre les PCI est primordiale.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de répondre à deux questions :

- Quels sont les mécanismes impliqués dans l'épuisement des TIL ?
- Quels LT répondent au blocage des PCI ?

Afin d'y répondre, j'ai étudié l'épuisement de plusieurs populations de LT infiltrant la tumeur et leur relation à la spécificité vis-à-vis de la tumeur et à la réponse au blocage de l'axe PD-1/PD-L1 chez les patients atteints de cancer.

RÉSULTATS

Dans mon travail de thèse, je me suis intéressée aux LT qui infiltrent la tumeur de patients atteints de cancer de l'ovaire, du col de l'utérus et des VADS. Ces types histologiques tumoraux sont principalement résistants (col de l'utérus, ovaire) ou partiellement répondeurs (VADS) au blocage de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique.

Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des TIL CD8. En utilisant différentes approches expérimentales, nous avons analysé l'expression des PCI et d'autres marqueurs d'inhibition au niveau transcriptionnel et protéique ainsi que l'activité effectrice et la spécificité des TIL CD8. Nous avons pu mettre en évidence une population de TIL CD8 épuisée qui exprime quatre PCI, des marqueurs d'inhibition et de résidence tissulaire et qui perdent l'expression de la molécule de co-stimulation CD28. Ces TIL CD8 épuisés ont néanmoins un fort potentiel cytotoxique, qu'ils n'exploitent pas dû à leur inhibition au site tumoral. De manière importante, cette population de TIL CD8 correspond aux LT spécifiques des Ag tumoraux. Nous avons analysé la capacité des LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux circulants ou infiltrant la tumeur des patients à répondre aux AcM anti-PD-1. Nous avons montré que le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 a une double action sur LT spécifiques de la tumeur. Il permet d'augmenter leur prolifération en périphérie et leur activité effectrice au site tumoral. Nous avons mis en évidence que les patients qui ont une infiltration élevée de ces TIL CD8 spécifiques des Ag tumoraux épuisés présentent une meilleure réponse à l'immunothérapie par AcM anti-PD-1/PD-L1 et une survie augmentée en comparaison aux patients qui ont une faible infiltration par cette population de leur tumeur.

Dans un deuxième temps, Nous avons analysé le rôle des TIL CD4 auxiliaires au site tumoral. Les LT CD4 soutiennent l'activation et la différenciation des LT CD8 en collaboration avec les DC dans les LN, leur rôle au site tumoral est moins connu. Dans cette étude, Nous avons analysé le profil transcriptomique, phénotypique et fonctionnel des LT CD4 infiltrant la tumeur des patients. Une sous-population de TIL CD4 exprime des marqueurs d'épuisement et sécrète peu de cytokines. Les LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux sont présents dans la sous-population de TIL épuisés. Nous avons montré que le blocage de l'axe PD-1/PD-L1, spécifiquement dans la population de TIL

RÉSULTATS

CD4, permet d'augmenter la maturation des DC et la prolifération des LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux qui s'en suit.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés aux $LT\gamma\delta$ infiltrant la tumeur des patients. Les $TIL\gamma\delta$ sont peu caractérisés et leur rôle dans le contrôle tumoral est controversé. Dans cette étude, Nous avons analysé le phénotype des $TIL\gamma\delta$ et avons comparé leur profil d'épuisement à celui des TIL CD8 et CD4 dans les trois cohortes de patients.

I) Article 1: Dual relief of T-lymphocyte proliferation and effector function underlies response to PD-1 blockade in epithelial malignancies

Contexte

Il est bien connu que les TIL CD8 sont dysfonctionnels, ce qui amène à l'échappement de la tumeur au SI. L'étude de l'épuisement des LT CD8 est largement restreinte aux modèles murins d'infection virale chronique ou de cancer. Chez l'homme, les recherches basées sur l'épuisement des TIL suscitent actuellement un grand intérêt. L'expression des PCI a d'abord été imaginée comme responsable de l'épuisement des LT dans la tumeur. Cependant, ces récepteurs sont aussi des marqueurs d'activation et leur blocage n'a pas une efficacité systématique en clinique. L'expression de ces PCI est une caractéristique des TIL épuisés et participe à leur inhibition. Cependant, les mécanismes exacts d'épuisement des LT chez les patients sont complexes et ne sont pas encore exactement bien décrits.

Le blocage des PCI peut être efficace pour réactiver l'immunité anti-tumorale, il a montré une efficacité clinique excellente dans plusieurs types de cancer. Cependant, une proportion importante de patients ne répond pas à ce traitement. Il est nécessaire d'identifier les mécanismes de résistance au traitement chez les patients non répondeurs. De plus, la compréhension des mécanismes d'action des AcM bloquant les PCI permettrait d'élaborer des stratégies thérapeutiques capables de réactiver les fonctions effectrices des LT CD8 et, *in fine*, de contrôler la croissance tumorale chez un plus grand nombre de patients.

Le ligand de PD-1, PD-L1 est actuellement utilisé comme biomarqueur de réponse à l'inhibition des PCI, cependant il n'est pas toujours fiable. L'identification de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques à la réponse à l'immunothérapie par blocage des PCI est nécessaire.



Dual Relief of T-lymphocyte Proliferation and Effector Function Underlies Response to PD-1 Blockade in Epithelial Malignancies

Camille-Charlotte Balança¹, Clara-Maria Scarlata¹, Marie Michelas¹, Christel Devaud¹, Victor Sarradin^{1,2}, Camille Franchet^{3,4}, Carlos Martinez Gomez^{1,5}, Carlos Gomez-Roca^{1,2}, Marie Tosolini⁶, Diana Heaugwane⁷, Françoise Lauzéral-Vizcaino^{1,4}, Lucile Mir-Mesnier⁸, Virginie Féliu¹, Carine Valle⁶, Frédéric Pont⁶, Gwénaél Ferron⁵, Laurence Gladieff², Stéphanie Motton⁹, Yann Tanguy Le Gac⁹, Agnès Dupret-Bories⁵, Jérôme Sarini⁵, Benjamin Vairel⁹, Claire Illac⁷, Aurore Siegfried-Vergnon³, Eliane Mery⁷, Jean-Jacques Fournié¹, Sébastien Vergez^{4,9}, Jean-Pierre Delord^{1,2,4}, Philippe Rochaix⁷, Alejandra Martinez^{1,5}, and Maha Ayyoub^{1,4,8}

ABSTRACT

Although understanding of T-cell exhaustion is widely based on mouse models, its analysis in patients with cancer could provide clues indicating tumor sensitivity to immune checkpoint blockade (ICB). Data suggest a role for costimulatory pathways, particularly CD28, in exhausted T-cell responsiveness to PD-1/PD-L1 blockade. Here, we used single-cell transcriptomic, phenotypic, and functional approaches to dissect the relation between CD8⁺ T-cell exhaustion, CD28 costimulation, and tumor specificity in head and neck, cervical, and ovarian cancers. We found that memory tumor-specific CD8⁺ T cells, but not bystander cells, sequentially express immune checkpoints once they infiltrate tumors, leading, *in situ*, to a functionally exhausted population. Exhausted T cells were none-

theless endowed with effector and tumor residency potential but exhibited loss of the costimulatory receptor CD28 in comparison with their circulating memory counterparts. Accordingly, PD-1 inhibition improved proliferation of circulating tumor-specific CD8⁺ T cells and reversed functional exhaustion of specific T cells at tumor sites. In agreement with their tumor specificity, high infiltration of tumors by exhausted cells was predictive of response to therapy and survival in ICB-treated patients with head and neck cancer. Our results showed that PD-1 blockade-mediated proliferation/reinvigoration of circulating memory T cells and local reversion of exhaustion occur concurrently to control tumors.

Introduction

CD8⁺ T cells targeting cancer antigens infiltrate tumors, and the extent of the CD8⁺ T-cell infiltrate correlates with better prognosis (1). Nonetheless, expression of inhibitory immune checkpoints (IC), such as PD-1, CTLA-4, TIGIT, and TIM-3, in tumor-infiltrating CD8⁺

T cells contributes to their functional exhaustion (2, 3). Therapeutic blockade of ICs is effective in the treatment of cancers of different histologic types. However, even in responsive malignancies, not all treated patients experience meaningful clinical responses (2). Understanding mechanisms of exhaustion and, consequently, those of response to immune checkpoint blockade (ICB) is necessary for the clinical development of next-generation immunotherapies and the identification of biomarkers of response.

Through analysis of transcriptomic and epigenetic profiles in murine models of chronic viral infection or cancer, a picture has emerged whereby exhausted T cells could represent a CD8⁺ T-cell lineage distinct from effector or memory cells (4–6). Tissue-resident memory T (Trm) cells represent, likewise, a distinct lineage of cells emerging during immune responses to infection (7–9). These cells reside in tissues, are maintained regardless of antigen persistence, and ensure protection upon local reencounter with infectious agents. In patients with cancer, CD8⁺ T cells expressing Trm markers have been identified (10, 11) and seem to overlap with exhausted T cells at tumor sites. It remains unclear, however, whether these cells represent, as in murine models of infection, CD8⁺ T-cell lineages or a functional state acquired at tumor sites.

ICs can limit T-cell priming and expansion by interfering with CD28-mediated costimulation and can control effector functions through the impairment of T-cell receptor (TCR) complex signaling (2, 12). PD-1 engagement leads to dephosphorylation of molecules in the TCR complex signaling pathway (13, 14), and studies have challenged this dogma and propose CD28 as the main target of PD-1 (15–17). These findings may seem at odds with the distribution of PD-1 ligands, in particular PD-L1 expressed at effector sites (18),

¹Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse, France.

²Department of Medical Oncology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ³Department of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁴Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

⁵Department of Surgery, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁶Technological Pole and Bioinformatic Platform, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse, France. ⁷Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁸Immune Monitoring Core Facility, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁹Department of Surgery, Centre Hospitalier Universitaire, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Immunology Research Online (<http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/>).

C.-C. Balança, C.-M. Scarlata, and M. Michelas contributed equally to this article.

Corresponding Author: Maha Ayyoub, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse 31100, France. Phone: 335-8274-1687; Fax: 335-8274-1685; E-mail: maha.ayyoub@inserm.fr

Cancer Immunol Res 2020;8:869–82

doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0855

©2020 American Association for Cancer Research.

and with the correlation of PD-L1 expression at tumor sites to response to PD-1/PD-L1 blockade (19). Precise assessment of PD-1 and CD28 expression in tumor-specific CD8⁺ T cells could contribute to the clarification of the relative contribution of ICB-mediated PD-1 inhibitory signal relief on expansion and effector functions of tumor-specific T cells.

Here, in ovarian, cervical, and head and neck cancers, three epithelial malignancies exhibiting resistance to ICB, we characterized exhaustion in tumor antigen-specific CD8⁺ T cells. We showed that along with chronic stimulation of tumor-specific T cells, IC expression was sequentially acquired, leading to a population expressing the four checkpoints PD-1, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3, which we called quadruple-positive (QP). Incremental checkpoint expression was accompanied by increased expression of Trm markers (8, 9), ectonucleotidase CD39 (20), and transcription factor TOX (21), and QP cells exhibited significant loss of CD28. QP cells were endowed with high cytotoxic potential. Circulating cancer antigen-specific T cells had a memory phenotype and expressed PD-1 and TIGIT only. At the tumor site, specific CD8⁺ T cells acquired an exhausted Trm-like phenotype. Circulating specific PD-1^{int}CD28⁺ T cells responded to anti-PD-1 by enhancing their proliferation in response to antigen stimulation, and specific PD-1^{hi}CD28^{+/−} tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) exhibited reversal of their functional exhaustion. QP cells were predictive of response to therapy and overall survival (OS) in patients with head and neck cancer treated by PD-1/PD-L1 blockade therapy. Our results show that the combination of proliferation/reinvigoration of circulating memory T cells that could replenish the tumor site combined with reversal of exhaustion at the tumor site contributes to PD-1/PD-L1 blockade-mediated tumor control.

Materials and Methods

Patient and healthy donor samples

Peripheral blood and tumor samples were collected from patients with head and neck, ovarian, and cervical cancer at the time of surgery for primary disease (54 patients) or for recurrence (1 patient) at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole (IUCT-O, Toulouse, France) in accordance to the Declaration of Helsinki, upon approval by the institutional review board (n°DC-2016-2656) and written informed consent. The study included: patients with stage FIGO IB1–IIIB HPV 16⁺ and/or 18⁺ cervical cancer with squamous and adenocarcinoma histology. Patients with stage FIGO IIIB–IVA high-grade serous or clear cell (1 patient) ovarian cancer and locally advanced, recurrent or metastatic head and neck squamous carcinoma. All patients had histologically documented tumors, were ≥18 years old at the time of study entry, were followed within a standard-of-care procedure, and had an Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0–2. Exclusion criteria included: known history of a positive test for hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency, or hantaviruses; any condition contraindicated with blood sampling procedures; pregnancy or breast feeding; and active, suspected, or prior documented autoimmune disease or use of immunosuppressive medication. Patients did not receive any therapy during the 3 months prior to study entry. Blood samples from 14 healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang.

Plasma was harvested after heparinized whole-blood centrifugation at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density-gradient sedimentation using Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Tumor samples were rapidly transported to the research facility on ice. On arrival, samples were rinsed with PBS (Sigma-Aldrich), subsequently minced on ice to smaller pieces

(between 2–4 mm), and dissociated using C-Tubes (Miltenyi Biotec) and the gentleMACS Octo Dissociator (Program MultiC01_01; Miltenyi Biotec) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma-Aldrich). PBMCs and tumor single-cell suspensions were cryopreserved in FBS (Gibco) containing 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

Pretreatment tumor biopsies used for IHC analyses were obtained from a second cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving ICB therapy with PD-1/PD-L1-blocking agents (nivolumab, *n* = 21; pembrolizumab, *n* = 1; durvalumab, *n* = 7; and avelumab, *n* = 1) to treat locally advanced or metastatic disease. Biopsies were either obtained up to 2 months prior to the first ICB dosing (5 patients) or retrieved from archival samples (25 patients: <1 year, 8 patients; ≥1 year and <2 years, 9 patients; ≥2 years and <3 years, 4 patients; and ≥3 years and <5 years, 4 patients). Samples were handled by the Biopathological Support Platform for Clinical Studies, IUCT-O. Response to therapy was evaluated by iRECIST criteria. Progressive disease (PD) was defined as the increase of >20% of target lesions or appearance and increase in size of new lesions in at least two CT scan evaluations performed at least 4 weeks apart. Partial response (PR) was defined as a decrease of >30% in target lesions and complete response (CR) as disappearance of target and non-target lesions, both in at least two CT scans performed at least 4 weeks apart. Any response other than PD or PR/CR was considered as stable disease (SD).

Cell purification and phenotypic assessment

CD8⁺ T cells were enriched from PBMCs or tumor single-cell suspensions by positive magnetic selection (CD8 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec) using OctoMACS Separator and MS Columns (Miltenyi Biotec). Cells (0.5 to 1×10^6 CD8⁺ T cells for PBMCs and 0.1 to 0.5×10^6 CD8⁺ T cells for TILs) were assessed phenotypically by staining with mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, PD-1, TIGIT, TIM-3, CD28, CD103, CD69, CD49a, and CD39, as indicated, in PBS containing 5% FBS, for 15 minutes at 4°C. For intracellular and intranuclear staining, cells were fixed and permeabilized with fixation/permeabilization buffer for 45 minutes at 4°C, and stained in permeabilization buffer for 45 minutes at 4°C with mAbs specific for CTLA-4, granzyme B, perforin, TCF-1, and TOX using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Antibodies used are listed in Supplementary Table S1. Where indicated, CD8⁺ T cells were stained with HLA class I dextramers containing NY-ESO-1 Peptides (Immunex) or pentamers containing CMV or EBV Peptides (ProImmune) for 30 minutes at room temperature prior to phenotypic assessment (see Supplementary Table S2 for the complete listing of multimers). Cells were analyzed using BD LSRFortessa X20, and data were analyzed using DIVA Software (BD Biosciences) or the vi-SNE Algorithm (Cytobank, Inc.).

In vitro differentiation of naïve CD8⁺ T cells

Naïve CD8⁺ T cells were enriched from PBMCs either by magnetic selection (Naïve CD8⁺ T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec) using QuadroMACS Separator and LS Columns (Miltenyi Biotec) or by total CD8⁺ T-cell-positive magnetic selection (CD8 MicroBeads, human, QuadroMACS Separator, LS Columns) followed by staining with mAbs specific for CD8, CD45RA, CCR7, and CD28, and naïve (CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺) CD8⁺ T cells were sorted via FACS (BD FACSaria Fusion). Antibodies are listed in Supplementary Table S1. Cells were then labeled with CFSE ($5 \mu\text{mol/L}$; eBioscience), stimulated with anti-CD3/28 beads (Miltenyi Biotec) at a bead-to-cell ratio of 1:1, and maintained in culture in the presence of recombinant human (rh)

IL2 (50 IU/mL; Miltenyi Biotec) and in the presence or absence of TGF β (50 ng/mL; PeproTech) in IMDM (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% penicillin-streptomycin Solution (Sigma-Aldrich), 1% MEM Nonessential Amino Acids Solution (Invitrogen), L-Glutamine (2 mmol/L, Invitrogen), and 10% human serum (Institut de Biotechnologies Jacques Boy). On day 7, cells were stained with CD3-, CD8-, CD45RA-, CCR7-, and CD28-specific mAbs (Supplementary Table S1) and analyzed by flow cytometry, as described above. In some experiments CD28⁻ cells were sorted from day 7 TGF β cultures via FACS (BD FACSMelody), restimulated with anti-CD3/28 beads (bead-to-cell ratio of 1:1) in the presence of rhIL2 (50 IU/mL) and in absence or presence of blocking PD-1 mAbs (10 μ g/mL; Bristol-Myers Squibb), and assessed 7 days later for CD28 expression by flow cytometry.

Droplet-based single-cell RNA-sequencing and single-cell gene expression analysis

Tumors, minced as detailed above, were transferred into digestion medium (Tumor Dissociation Kit, human, Miltenyi Biotec) and dissociated using C-tubes and gentleMACS Octo Dissociator (Program h_TDK3, 37°C, Miltenyi Biotec). Samples were filtered using a 40- μ m Nylon Mesh (BD Biosciences). Cell suspensions were then centrifuged at 300 \times g at 4°C for 7 minutes, the supernatant was discarded. Cell pellets were resuspended in 1 mL Red Blood Cell Lysis Buffer (Miltenyi Biotec), incubated for 10 minutes at 4°C, centrifuged, and the pellets were resuspended in PBS containing 0.04% BSA (Euromedex). CD45⁺ cells were enriched by positive magnetic selection from single-cell suspensions (CD45 MicroBeads, human, OctoMACS Separator, MS Columns, Miltenyi Biotec), and cells were counted to determine the proportion of live cells. Only samples containing >90% live cells were used for single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) experiments. CD45⁺ cells (2 to 4 \times 10⁵ cells) were stained with barcoded TotalSeq-A mAb (BioLegend).

Single-cell libraries (3' gene expression and antibody-derived tag fractions) were generated using the Chromium Controller Instrument and Chromium Single Cell 3' Library and Gel Bead Kit v3 according to the manufacturer's protocol (10 \times Genomics) with some modifications as described previously (22). To detect barcoded TotalSeq-A antibodies, an ADT library was constructed as previously described for CITE-seq (22). Single-cell library size and quality were confirmed on Fragment Analyzer (Agilent). KAPA Quantification Kit for Illumina platforms (Kapa Biosystems, Roche) was used to quantify library. Samples were pooled in equimolar fashion with desired proportions for the two library types (cDNA library fraction at 90% and ADT library at 10%). The libraries were sequenced on a NextSeq 550 (Illumina) in pair-end sequencing 28 bp (read1) \times 91 bp (read2) and a single index 8 bp in length. Raw data (FastQ files) for expression and antibody detection were computed with CellRanger 3.0 and the GRCh38 transcriptome as reference (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/using/count>). Data were then loaded in an R session with the Seurat 3.0 toolkit package involving the normalization and variance stabilization package *sctransform* (23). Samples were individually filtered using unique molecular identifier (<30/000) and percentage of mitochondrial genes (<0.25%) criteria. Using Seurat, datasets were reduced by principal component analysis using the 11 first principal components to reduce dimensionality by t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE). A resolution parameter set the granularity at 1.2 for the clustering by the K-nearest neighbor graph-based clustering approach of Seurat's FindClusters function. CD8⁺ T lymphocytes were selected using Single-Cell Virtual Cytometer software (<https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/single-cell-virtual-cytometer>) using the sum of CD3D, CD3E, and CD3G gene expression and CD8B gene expression. Wilcoxon *P* values for differentially expressed genes were adjusted with Benjamini-Hochberg and illustrated in a volcano plot. The maturation trajectories of the selected T cells were computed with FateID as described previously (24), specifying CD8⁺ T cells in cluster 5 (Fig. 3A) as an endpoint. The gene set enrichment analysis of the coexpression nodes, here, taken as lists of genes, were computed with Autocompare-ZE (<https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/autocompare-ze>) for enrichment for gene sets from the C5 collection of gene ontology (GO) database (GSEA/MSigDB database, v6.3; refs. 25–27). ScRNA-seq data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO; ref. 28) and are accessible through GEO series accession number GSE148162.

com/site/fredsoftwares/products/single-cell-virtual-cytometer) using the sum of CD3D, CD3E, and CD3G gene expression and CD8B gene expression. Wilcoxon *P* values for differentially expressed genes were adjusted with Benjamini-Hochberg and illustrated in a volcano plot. The maturation trajectories of the selected T cells were computed with FateID as described previously (24), specifying CD8⁺ T cells in cluster 5 (Fig. 3A) as an endpoint. The gene set enrichment analysis of the coexpression nodes, here, taken as lists of genes, were computed with Autocompare-ZE (<https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/autocompare-ze>) for enrichment for gene sets from the C5 collection of gene ontology (GO) database (GSEA/MSigDB database, v6.3; refs. 25–27). ScRNA-seq data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO; ref. 28) and are accessible through GEO series accession number GSE148162.

T-cell functional assessment

CD8⁺ T cells isolated from tumor single-cell suspensions were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich) or plate-bound anti-CD3 (1 μ g/mL; eBioscience) in the presence of anti-CD107a (Supplementary Table S1) for 6 hours in IMDM supplemented as described above. Brefeldin-A (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) was added 1 hour after the beginning of the incubation. Cells were then stained with mAbs, as described above, specific for CD3, CD4, CD8, and PD-1, and cytokine production was assessed by intracellular staining using IFN γ - and TNF α -specific mAbs (Supplementary Table S1). The cells were analyzed by flow cytometry (BD LSRFortessa X20).

For the assessment of NY-ESO-1-specific cells, CD8⁺ T cells were magnetically sorted from PBMCs and tumor single-cell suspensions, as already described, from patients with ovarian cancer exhibiting antibody responses to NY-ESO-1. Antibody responses to NY-ESO-1 were assessed in patient plasma by ELISA, as described previously (29) and detailed hereafter. Eighteen overlapping 20- to 24-amino acid long peptides encompassing the full-length NY-ESO-1 sequence (25 μ g/mL each in PBS; Peptide 2.0 Inc) were coated on Nunc MaxiSorp Flat-Bottom ELISA Plates (Thermo Fisher Scientific) overnight at 4°C. Plates were then washed with PBS, 0.005% Tween (Sigma-Aldrich), incubated for 2 hours at 37°C with blocking buffer (PBS, 2% BSA), and washed with PBS, 0.005% Tween. Plasma (diluted 1/100 in blocking buffer) was incubated for 2 hours at room temperature and washed using the same buffer. Plates were then incubated for 1 hour at room temperature with goat anti-human IgG secondary antibodies (Sigma-Aldrich; 1 μ g/mL in blocking buffer) and washed. ELISA was developed using the Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA (Sigma-Aldrich). Isolated CD8⁺ T cells (20,000 to 150,000 CD8⁺ T cells from TILs and 2 to 5 \times 10⁵ CD8⁺ T cells from PBMCs, per well) were stimulated with NY-ESO-1 peptides (1 μ mol/L; Peptide 2.0 Inc) in the presence of autologous CD14⁺ cells sorted from PBMCs by positive magnetic selection (CD14 MicroBeads, human, OctoMACS Separator and MS Columns, Miltenyi Biotec) at a 1.5-to-1 CD14⁺-to-CD8⁺ cell ratio, and rhIL2 (50 IU/mL) in the absence or presence of PD-1-blocking mAb (10 μ g/mL) in IMDM supplemented as above. Day 5–7 cultures were either stained with HLA class I dextramers containing NY-ESO-1 peptides and with anti-CD8 or stimulated or not with NY-ESO-1 peptides (1 μ mol/L) and assessed for IFN γ and TNF α production by intracellular staining, as detailed above.

Quantitative multiplex IHC

Sequential chromogenic IHC was performed on 4- μ m-thick tumor tissue sections based on the protocol described by Glass and colleagues

with some modifications (30) using mAbs listed in Supplementary Table S3. Briefly, slides were dewaxed, subjected to heat-mediated antigen retrieval (Target Retrieval Buffer pH9 K800021-2, Dako Agilent), and immunostained using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Dako Agilent) as chromogen according to the manufacturer's recommendations. To preserve antigens, slides were then mounted with an Aqueous Mounting Medium (Dako Agilent) containing 60% glycerol, 40% distilled H₂O, and 10% (w/w) saturated sucrose-H₂O (584 mmol/L; ref. 30) and scanned using Panoramic 250 Flash III Scanner (3DHISTECH Ltd.). After scanning, AEC and antibodies were removed. Slides were unmounted and washed with distilled H₂O before being discolored with increasing gradients of absolute ethanol (70%–90%, Sigma-Aldrich) according to the SIMPLE1 method (30), and rinsed with distilled H₂O. Antibody stripping was performed by incubation of slides for 30 minutes at 56°C in a freshly prepared stripping buffer [1% SDS (w/v, Sigma-Aldrich), 0.2 mol/L Tris HCl pH 6.8 (ClniScience), and 0.1 mol/L β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) in distilled H₂O; ref. 31], followed by rinsing with distilled H₂O for 45 minutes. The entire sequence was repeated for each antigen assessed.

For each case, at least one region of interest (ROI) of 5,000 × 5,000 pixels (1,200 μm²) was selected and extracted from each of the virtual slides using ImageScope (Aperio Leica Biosystems). Extracted images were registered using ImageJ “Register Virtual Stack Slices” plugin and color-deconvoluted using FIJI (1.52n). Nuclei segmentation was performed with ILASTIK software. Cell identification, staining evaluation, and results export in csv format was performed using CellProfiler software. Pathologists defined fluorescence value for each cell and each marker in the ROI and the positivity thresholds for each marker. These thresholds were used for the determination of CD3⁺CD8⁺ (CD8⁺ T cells) and CD3⁺CD8⁺TIM-3⁺ (TIM-3⁺CD8⁺ T cells) cell proportions among all nuclei. The median of CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD8⁺TIM-3⁺ cell proportions in all patients was used as cutoff to define high (≥median) and low (<median) infiltration for each population.

In vivo experiments

Female C57BL/6 mice, 7 weeks old, were purchased from Janvier Labs. Experimental protocols were approved by regional Ethic Committee of Toulouse Biological Research Federation (C2EA-01, FRBT) and by the French Ministry for Higher Education and Research. The European directive 2010/63/EU was followed for guidelines on animal welfare. TC1 cells expressing the HPV 16-E6 and E7 proteins were developed in the laboratory of T.C. Wu (Department of Pathology, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Cells were cultured in complete RPMI1640 Medium (Life Technologies) for 2–6 passages and tested negative for *Mycoplasma*.

When 8 weeks old, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of anesthetic mix [10 μL/kg; made up of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg); Centravet], and implanted in the oral cavity (intracheek) with 3 × 10⁴ TC1 cells suspended in a final volume of 10 μL of PBS using a Hamilton syringe and 30G needle. At day 10 and 18, mice were sacrificed by intraperitoneal injection of anesthetic mix (10 μL/kg), followed by vertebral dislocation. Oral tumors were harvested, cut in pieces, and enzymatically digested using the Mouse Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec), C-tubes, and gentleMACS Octo Dissociator (program 37C_m_TDK_1). Digestion was followed by filtration through a 70-μm cell strainer. Cells were resuspended in PBS containing 2% FBS, anti-CD16/CD32 (Supplementary Table S1), and 1:1,000 Fixable Viability Dye Stain 700 (BD Biosciences). Staining with mAbs specific for cell surface markers

(Supplementary Table S1) and flow cytometry analyses were performed as described above for human samples.

Statistical analyses

Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. For normally distributed values, the *t* test was used for paired or unpaired data. When the values were not normally distributed, the comparison of variables was performed with Wilcoxon or Mann–Whitney test for paired and unpaired data, respectively. Lines and error bars in scatter plots represent mean ± SD. For correlations, Pearson test was used to compare variables. For OS analyses, ICB-treated patients were subdivided into two groups according to high (≥median) and low (<median) tumor infiltration by CD8⁺ T cells or TIM-3⁺CD8⁺ T cells, Kaplan–Meier curves were plotted, and *P* values determined by log-rank test. Results of statistical analyses are annotated as follows in figures: ns, not significant (*P* ≥ 0.05); *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001. All analyses were performed with GraphPad Prism 7 software.

Results

IC expression defines six tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell populations

We assessed *ex vivo* CD8⁺ ovarian, cervical, and head and neck cancer (HNC) TILs for PD-1, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3. Each of the four checkpoints was expressed in the three tumor types (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1A). PD-1 was on average expressed in a higher proportion of cells, followed by TIGIT, CTLA-4, and TIM-3. Although TIGIT could be expressed both independently and alongside PD-1 (Supplementary Fig. S1A, left contour plots), CTLA-4 and TIM-3 expression appeared systematically associated to that of PD-1 (Supplementary Fig. S1A, center and right contour plots, respectively). This was supported by correlation analyses, which revealed significant positive correlation between the proportion of PD-1-expressing cells and those expressing CTLA-4 and TIM-3 but not TIGIT (Supplementary Fig. S1B). We then analyzed CTLA-4 and TIM-3 expression in cells expressing or not PD-1 and TIGIT (Fig. 1B). The majority of PD-1⁺TIGIT[−] cells did not express CTLA-4 and TIM-3, which we named “quadruple-negative” (QN). PD-1⁺TIGIT[−] and PD-1[−]TIGIT⁺ cells did not express CTLA-4 and TIM-3. We named these cells “PD-1 single” (PD-1s) and “TIGIT single” (TIGITs), respectively. PD-1⁺TIGIT⁺ cells could be divided into three populations according to CTLA-4 and TIM-3 expression: (i) expressed neither CTLA-4 nor TIM-3; (ii) expressed CTLA-4 only; and (iii) expressed both, called “double-positive” (DP), “triple-positive” (TP), and “quadruple-positive” (QP), respectively (Fig. 1B). Among the 16 possible coexpression profiles (Fig. 1B, bottom), the six populations described above were the most frequently and consistently detected in the three tumor types. The QP population showed the highest inter-individual variation (range 0.7%–62%, median 20.69%). Similar analyses from circulating memory/effector CD8⁺ T cells from healthy individuals and patients with cancer showed that only QN, PD-1s, TIGITs, and DP populations were detectable, implying that acquisition of CTLA-4 and TIM-3 expression takes place *in situ* (Supplementary Fig. S2).

In CD8⁺ TILs, we found that cells expressing both PD-1 and TIGIT exhibited higher staining intensity for both markers compared with cells expressing each alone (Fig. 1B; Supplementary Fig. S1A, left contour plots). Analysis of mean fluorescence intensity (MFI) showed that PD-1 MFI incrementally and significantly increased in parallel to the number of expressed ICs in each PD-1⁺ population (Fig. 1C, left).

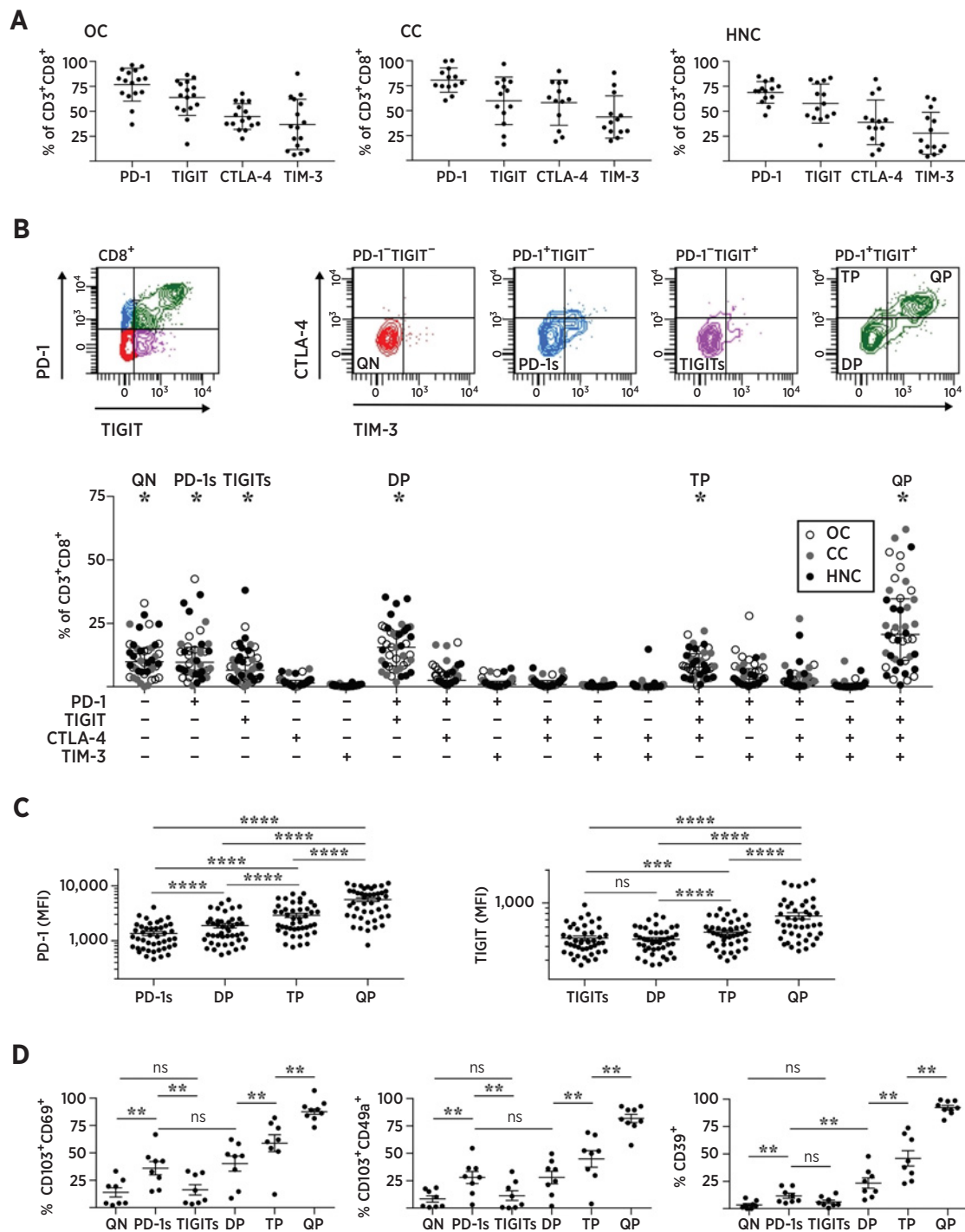


Figure 1.

Coexpression of ICs defines six tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell populations. CD8⁺ TILs were stained *ex vivo* with mAbs specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3, CD103, CD69, CD49a, and CD39 and analyzed by flow cytometry. **A**, Proportion of CD8⁺ TILs expressing PD-1, TIGIT, CTLA-4, or TIM-3 for three malignancies (ovarian cancer, OC, *n* = 17; cervical cancer, CC, *n* = 12; and HNC, *n* = 15). Nineteen independent experiments. Examples of contour plots are shown in Supplementary Fig. S1A. **B**, Representative contour plots showing CD8⁺ T-cell CTLA-4 and TIM-3 expression (top right) from gated PD-1⁺TIGIT⁺, PD-1⁺TIGIT⁺, and PD-1⁺TIGIT⁺ populations (top left). Data corresponding to the proportion of each of the 16 combinations of IC expression are summarized (numbers of samples are as in **A**; bottom). Median proportions, among CD8⁺ TILs, for six subpopulations (*) was >5%. **C**, MFI of PD-1 and TIGIT in PD-1⁺ and TIGIT⁺ cells, respectively, among CD8⁺ TIL subpopulations. **D**, Proportion of CD103⁺CD69⁺, CD103⁺CD49a⁺, and CD39⁺ cells among the six CD8⁺ TIL subpopulations identified in **B** (ovarian cancer, *n* = 5; cervical cancer, *n* = 2; and HNC, *n* = 2; five independent experiments). Examples of dot plots and histogram plots are shown in Supplementary Fig. S4. The Wilcoxon test was used to compare variables (ns, not significant; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001).

A similar pattern was observed for TIGIT, although the MFI did not vary significantly between the TIGITs and DP populations (Fig. 1C, right).

Altogether, these analyses revealed a conserved pattern of IC expression in the three tumor types, which defined six CD8⁺ T-cell populations. Analysis of PD-1 and TIGIT suggested an increase in their expression alongside a possible sequential acquisition of CTLA-4 followed by TIM-3. In an orthotopic mouse model of HNC, PD-1 MFI at the tumor site was, likewise, increased in PD-1⁺CD8⁺ T cells coexpressing TIM-3 compared with those expressing PD-1 only (Supplementary Fig. S3). In further support of the sequential acquisition model, the proportion of PD-1⁺TIM-3⁺ cells was higher at day 18 than day 10 tumors (Supplementary Fig. S3A).

IC acquisition is paralleled by Trm markers and CD39 expression, and CD28 loss

We assessed the expression of Trm markers, CD103, CD69, and CD49a (8), and CD39, also expressed in CD103⁺CD8⁺ T cells at tumor sites (20), in the six CD8⁺ T-cell populations identified (Fig. 1D; Supplementary Fig. S4). Trm markers and CD39 were absent or expressed in low proportions in QN and TIGITs populations. Their proportions were significantly higher among PD-1s cells versus QN cells. Whereas no difference in Trm marker expression was detected between PD-1s and DP cells, CD39 expression was significantly higher in the DP population. Expression of all markers significantly increased within the TP population relative to DP cells and was further increased in the QP population. These data further supported the serial acquisition pattern of ICs by CD8⁺ T cells at the tumor site.

The sequential acquisition of ICs is indicative of sustained T-cell stimulation and could imply disparities in the differentiation stage between cells expressing few or several ICs. Assessment of the differentiation stage of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells showed that the population was homogenous and mostly composed of effector memory cells (CD45RA⁺CCR7⁺; Fig. 2A). Effector memory cells are composed of cells expressing CD28 and cells in a more advanced differentiation stage that are CD28[−] (32). We found that effector memory TILs contained a significantly lower proportion of CD28⁺ cells versus circulating effector memory cells (Fig. 2B; Supplementary Fig. S5A). The CD28[−] population at the tumor site was enriched in cells expressing the four ICs (Fig. 2C), suggesting loss of CD28 alongside IC acquisition. Analysis of CD28 expression according to IC coexpression profiles defined above showed significant loss in CD28 expression in the QP population (Fig. 2D; Supplementary Fig. S5B). Unsupervised integration of flow cytometry data using vi-SNE (33) identified a QP population expressing Trm markers and CD39 while being CD28[−] (Fig. 2E).

We sought to identify tumor-related factors underlying CD28 loss. The QP population was characterized by CD103 and high PD-1 expression, two features that depend on TGFβ signaling (9, 34). We found that *in vitro* stimulation of naïve CD8⁺ T cells in the presence of TGFβ led to an enhanced loss of CD28 (Fig. 2F; Supplementary Fig. S5C). This was not simply due to progression in the differentiation stage as TGFβ led to delayed differentiation (Fig. 2G). Loss of CD28 could not be recovered by PD-1 blockade of stimulated CD28[−] cells, isolated from TGFβ cultures (Supplementary Fig. S5D).

scRNA-seq reveals active immune pathway signatures in IC-positive CD8⁺ T cells

To characterize the QP population, we performed scRNA-seq of total tumor-infiltrating CD45⁺ cells isolated from 2 patients with HNC. A total of 17.9% were identified as CD8⁺ T cells and their

clustering identified 11 clusters (Fig. 3A, top left). Clusters 0, 1, 4, 5, and 9 showed the highest *HAVCR2* (TIM-3) expression (Fig. 3A). *CTLA4* was found in the same clusters as well as in clusters 7 and 3. Expression of *TIGIT* was found in most clusters, although it was more frequent in clusters expressing *HAVCR2*. *PDCD1* (PD-1) was also detected in most clusters, although the frequency of positive cells was lower than expected, presumably owing to low levels or low detection of this specific mRNA. Clusters 1, 4, 5, and 9 contained the highest proportion of cells exhibiting a QP profile and also contained cells expressing *ITGAE* (CD103), *ITGA1* (CD49a), and *ENTPD1* (CD39; Fig. 3A). We then performed differential mRNA expression analysis between regrouped clusters 1, 4, 5, and 9 and all other clusters. We identified 761 genes with higher expression in the QP clusters and 94 with higher expression in the other clusters (Fig. 3B). Genes shown in green in the volcano plot (Fig. 3B) correspond to markers we had used to characterize these populations (Fig. 2E), and their expression (Fig. 3C) confirmed that clusters on the right side of the t-SNE plot were most representative of the QP population.

Consistent with IC expression, QP clusters expressed *TOX*, which encodes a DNA-binding protein involved in T-cell exhaustion (Fig. 3B and C; ref. 21). Differential analysis identified a clear cytotoxicity signature in QP clusters, including granzymes A, B, and H (*GZMA*, *GZMB*, and *GZMH*, respectively), perforin (*PRF1*), and granulysin (*GNLY*; Fig. 3B and C). Twenty-one transcription factors were previously identified as being key for memory CD8⁺ T-cell development and function (35). Of those, seven were differentially expressed in our analysis with *SOX-4* (*SOX4*), Class E bHLHe40 (*BHLHE40*), *PRDM1*, and *RUNX2* being more expressed in the QP clusters and *KLF2*, T-cell factor 1 (*TCF-1*, *TCF7*), and *BACH2* in the other clusters (Fig. 3B and D). Expression of *SOX-4* is promoted by TGFβ (36) and induces *CXCL13* production by CD4 T cells (37). *CXCL13* was more expressed in QP clusters (Fig. 3B and D). Among transcription factors that were less expressed in QP clusters, *KLF2* has been shown to be downregulated in Trm cells, leading to downmodulation of *S1PR1* expression (7). Differential analysis showed lower *S1PR1* expression in QP clusters (Fig. 3B and D). *TCF-1* (*TCF7*) was also less expressed in QP clusters. In addition to *TCF7* and *CD28*, other early memory T-cell markers were also less expressed in QP clusters, including *CCR7* and *IL7R* (Fig. 3B and D). Differential analysis also revealed higher expression of the chemokine receptor gene *CXCR6* in QP clusters (Fig. 3B and D).

We then computed a pseudotime maturation trajectory anchored by cluster 5 cells as an endpoint (Fig. 3A). Visualizing gene expression in cells along this trajectory showed *TCF7*, *IL7R*, and *CCR7* expression in cells clustered at early stages of the maturation trajectory, whereas cells expressing ICs, Trm and cytotoxicity markers, as well as *CXCL13* and *CXCR6*, clustered at later stages of the trajectory (Fig. 3E). Respective expression profiles of chronologically ordered cells were then Z-score transformed to reveal putative temporally restricted gene sets. This identified 21 gene expression nodes, which were then analyzed for enrichment of signatures from the C5 collection of GO database. This unveiled the prominence of translational signatures during the earliest maturation stages (nodes 16–20), followed in the latest stages by signatures of immune responses (nodes 1–3; Supplementary Fig. S6). These results revealed that exhausted Trm-like QP cells are the most immunologically active CD8⁺ T cells at the tumor site.

IC QP CD8⁺ T cells are tumor-specific and respond to PD-1 inhibition

We next assessed QP cell effector function, antigen specificity, and response to PD-1 inhibition. Tumor-infiltrating CD8⁺ T cells showed

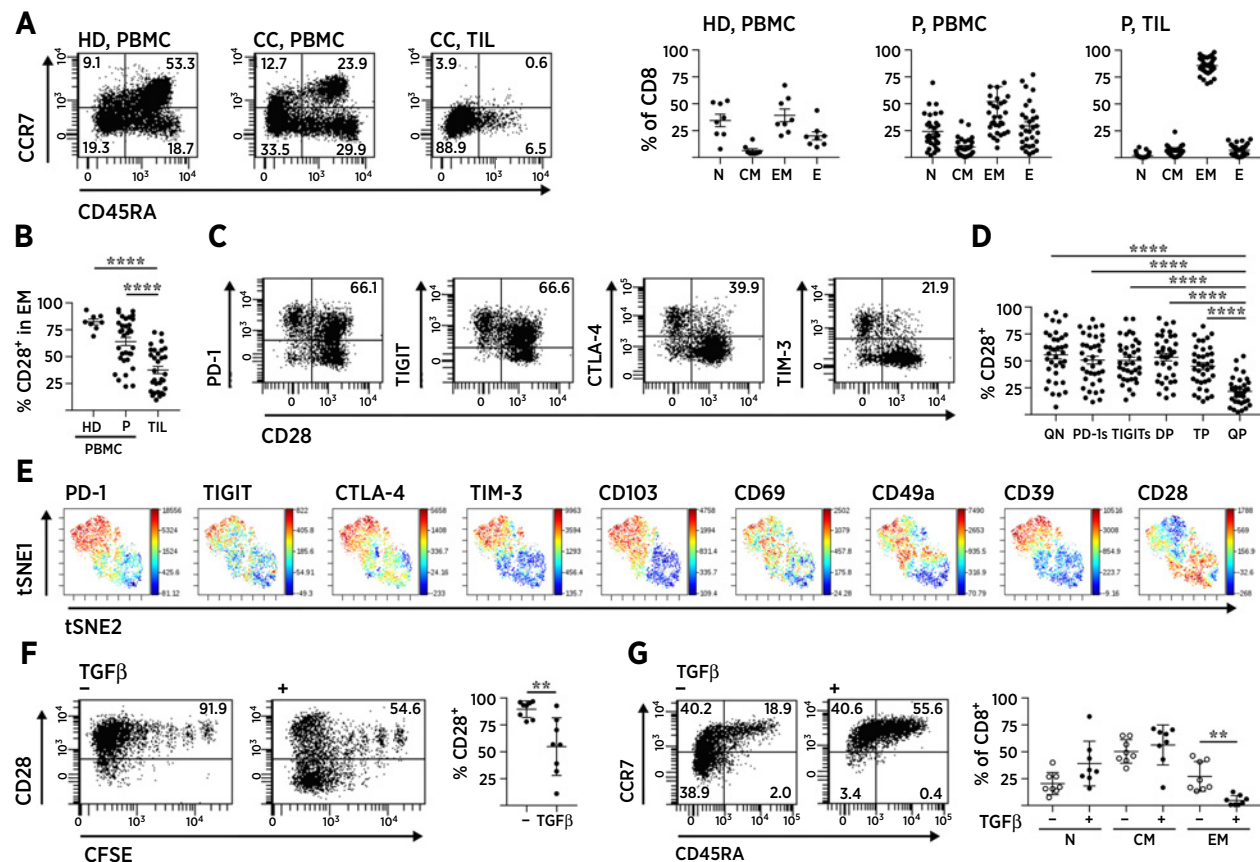


Figure 2.

TGFβ-mediated loss of CD28 in QP CD8⁺ TILs. **A**, Expression of CCR7 versus CD45RA *ex vivo* in CD8⁺ T cells from 1 healthy donor (HD) and 1 patient with cervical cancer (CC; left). Proportions of naïve (N), central memory (CM), effector memory (EM), and effector (E) CD8⁺ T cells are summarized (right). Healthy donor PBMCs, *n* = 8; patient (P) PBMCs (ovarian cancer, *n* = 12; cervical cancer, *n* = 9; and HNC, *n* = 11); and TILs (ovarian cancer, *n* = 17; cervical cancer, *n* = 11; and HNC, *n* = 9). Twenty independent experiments. **B**, Proportion of CD28⁺ cells among EM CD8⁺ T cells is summarized. Histogram plots are shown in Supplementary Fig. S5A. Healthy donor PBMCs, *n* = 8; patient PBMCs (ovarian cancer, *n* = 13; cervical cancer, *n* = 9; and HNC, *n* = 11); and TILs (ovarian cancer, *n* = 16; cervical cancer, *n* = 8; and HNC, *n* = 7). Eighteen independent experiments. **C**, Expression of CD28 versus PD-1, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3 in CD8⁺ T cells from 1 representative ovarian cancer patient's TILs. **D**, Proportion of CD28⁺ cells in the six CD8⁺ TIL subpopulations defined as in Fig. 1B. Ovarian cancer, *n* = 16; cervical cancer, *n* = 10; and HNC, *n* = 11. Ten independent experiments. CD28 staining is shown in Supplementary Fig. S5B. **E**, t-SNE plots of flow cytometry data of CD8⁺ TILs (ovarian cancer, *n* = 1; cervical cancer, *n* = 1; and HNC, *n* = 1). **F** and **G**, Naïve CD8⁺ T cells were sorted from PBMCs of healthy donors (Supplementary Fig. S5C), CFSE labeled, and stimulated with anti-CD3/CD28 in the absence (-) or presence (+) of TGFβ. Day 7 cultures were stained for CD3, CD8, CCR7, CD45RA, and CD28 and analyzed by flow cytometry (healthy donors, *n* = 8; three independent experiments). **F**, CD28 versus CFSE staining in CD8⁺ T cells for 1 healthy donor (left); the proportion of CD28⁺ cells is summarized (right). **G**, CCR7 versus CD45RA expression in CD8⁺ T cells (left); the proportion of naïve, central memory, and effector memory cells is summarized for each stimulation condition (right). *P* values were calculated using Mann-Whitney test (**B**), Wilcoxon test (**D-G**), and paired *t* test (**F**; **, *P* < 0.01; ****, *P* < 0.0001).

progression in TOX expression along IC acquisition (Fig. 4A and B; Supplementary Fig. S7A and S7B). An opposite pattern was observed for the expression of TCF-1 (Supplementary Fig. S8A). Absence of TCF-1 in late-stage populations at the tumor site was in agreement with its progressive loss along differentiation in circulating CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. S8B and S8C). Expression of granzyme B and perforin, inferred from scRNA-seq analyses, was also confirmed at the protein level. The proportion of cells expressing both proteins was higher in the QP population than in other CD8⁺ TILs (Fig. 4A and B). This was consistent with their CD28⁻ phenotype indicating advanced differentiation (32).

To validate the effector potential of QP cells, we stimulated tumor-infiltrating CD8⁺ T cells with PMA/ionomycin (i.e., bypassed proximal TCR signaling and IC inhibition). PMA/ionomycin stimulation perturbed, in some samples, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3 expression but not that of PD-1. We, therefore, analyzed cytokine production and

CD107a surface expression in CD8⁺ populations defined by PD-1 expression (Fig. 4C). PD-1⁻ cells encompassed the QN and TIGITs populations, PD-1^{int} corresponded to PD-1s and DP populations, and PD-1^{hi} represented the TP and QP populations (Fig. 1B and C). Our data showed that PD-1^{hi} cells were able to release cytotoxic granules and produce cytokines (Fig. 4D and E). Compared with the two other populations, PD-1^{hi} cells encompassed fewer polyfunctional cells, that is, able to produce both IFNγ and TNFα, and more IFNγ⁺TNFα⁻ cells (Fig. 4E), a feature that has been associated with exhaustion (38). Accordingly, upon anti-CD3 instead of PMA/ionomycin stimulation, PD-1^{hi} cells comprised fewer cytokine-producing cells than less exhausted, PD-1⁻ and PD-1^{int}, populations (Fig. 4F).

NY-ESO-1, a cancer testis antigen expressed in ovarian cancer, induces both antibody and T-cell responses (29). Several NY-ESO-1-derived CD8⁺ T-cell epitopes are presented by frequently expressed HLA class I alleles (39). Within the ovarian cancer cohort, we identified

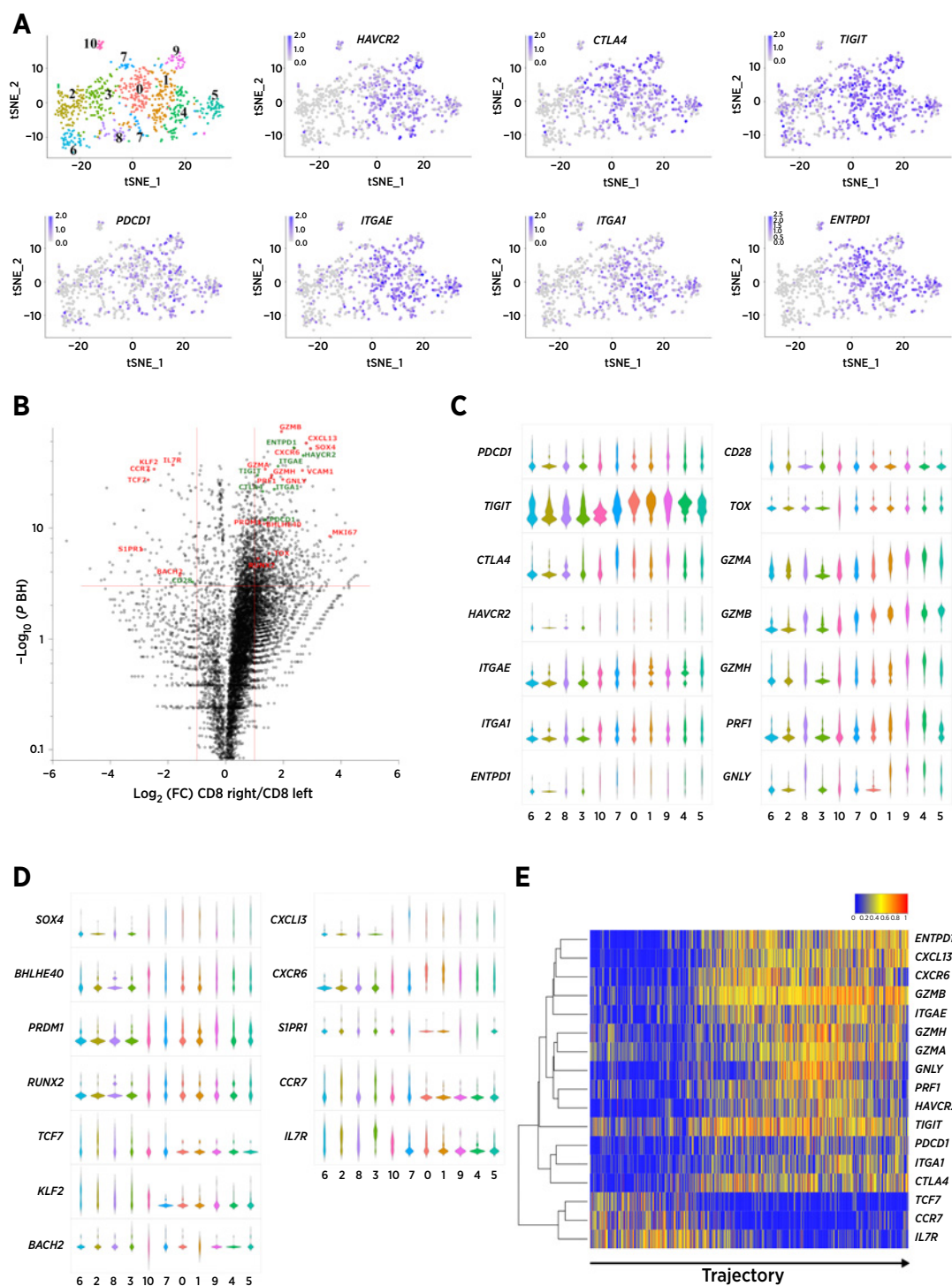
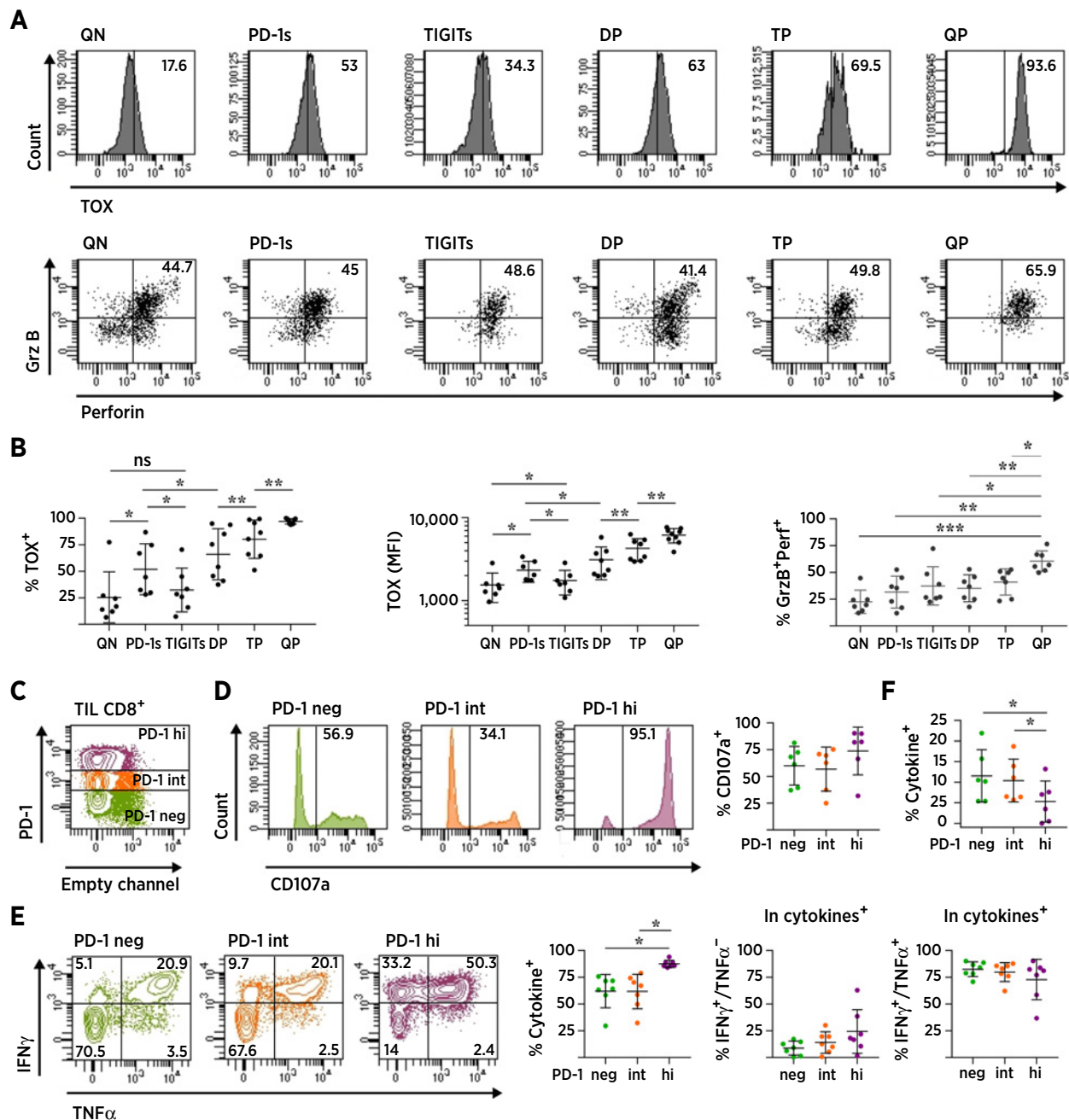


Figure 3. ScRNA-seq reveals cytotoxic and active immune pathway signatures in IC-positive CD8 T cells. CD45⁺ cells isolated *ex vivo* from two HNC specimens were subjected to scRNA-seq. **A**, t-SNE plots of 752 CD8⁺ T cells (top left) color-coded by their associated cluster and t-SNE plot color-coded for expression (gray to blue) of *HAVCR2*, *CTLA4*, *TIGIT*, *PDCD1*, *ITGAE*, *ITGA1*, and *ENTPD1*. **B**, Differential analysis of scRNA-seq data from clusters 1, 4, 5, and 9 versus those from the remaining clusters. Genes encoding markers used above to characterize CD8⁺ TILs are shown in green, and part of the new genes identified with significant differential expression are shown in red. **C** and **D**, Violin plots showing the expression of selected genes in the 11 clusters. x-axes indicate cluster number. **E**, FateID heatmap based on the trajectory identified by pseudotime analysis (Supplementary Fig. S6).

**Figure 4.**

IC QP cells retain effector potential. **A** and **B**, CD8⁺ TILs were stained *ex vivo* with mAbs specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3, TOX, granzyme B (GrzB), and perforin (Perf) and analyzed by flow cytometry. **A**, Histograms showing TOX expression (top) and dot plots of granzyme B versus perforin expression (bottom) in the indicated CD8⁺ TIL subpopulations. The cutoff for TOX staining was determined on the basis of TOX staining in CD8⁺ T cells from PBMCs (Supplementary Fig. S7A). **B**, Proportion of TOX⁺ cells (left), MFI of TOX staining in total cells in each population (middle; ovarian cancer, *n* = 4; cervical cancer, *n* = 3; and HNC, *n* = 2; two independent experiments), and proportion of GrzB⁺Perf⁺ cells (right; ovarian cancer, *n* = 4; cervical cancer, *n* = 2; HNC, and *n* = 1; four independent experiments) in CD8⁺ TIL subpopulations are summarized. CD8⁺ TILs were stimulated *ex vivo* with PMA/ionomycin (two independent experiments; **C–E**) or anti-CD3 (two independent experiments; **F**) in the presence of anti-CD107a and brefeldin-A for 6 hours. Cells were then stained for CD3, CD8, PD-1, IFN γ , and TNF α and analyzed by flow cytometry. **C**, Gating strategy based on PD-1 expression (PD-1^{neg}, green; PD-1^{int}, orange; and PD-1^{hi}, purple; maintained throughout figure). **D**, Histogram plots showing surface CD107a expression gated on the indicated populations (left). Proportions of CD107a⁺ cells in each population are summarized (right; ovarian cancer, *n* = 5 and HNC, *n* = 1). **E**, IFN γ versus TNF α staining gated on the indicated populations (left). The proportion of total cytokine⁺ (IFN γ and/or TNF α) cells, as well as those of IFN γ single-positive and IFN γ /TNF α double-positive cells among total cytokine⁺ cells are summarized for each CD8⁺ TIL subpopulation (right; ovarian cancer, *n* = 6 and HNC, *n* = 1). **F**, Proportion of total cytokine⁺ (IFN γ and/or TNF α) cells among each CD8⁺ TIL subpopulation (cervical cancer, *n* = 2 and HNC, *n* = 4). *P* values were determined using the Wilcoxon test (**B**, %TOX⁺ and TOX MFI; **E**) or paired *t* test (**B**, %GrzB/Perf⁺; **F**; ns, not significant; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

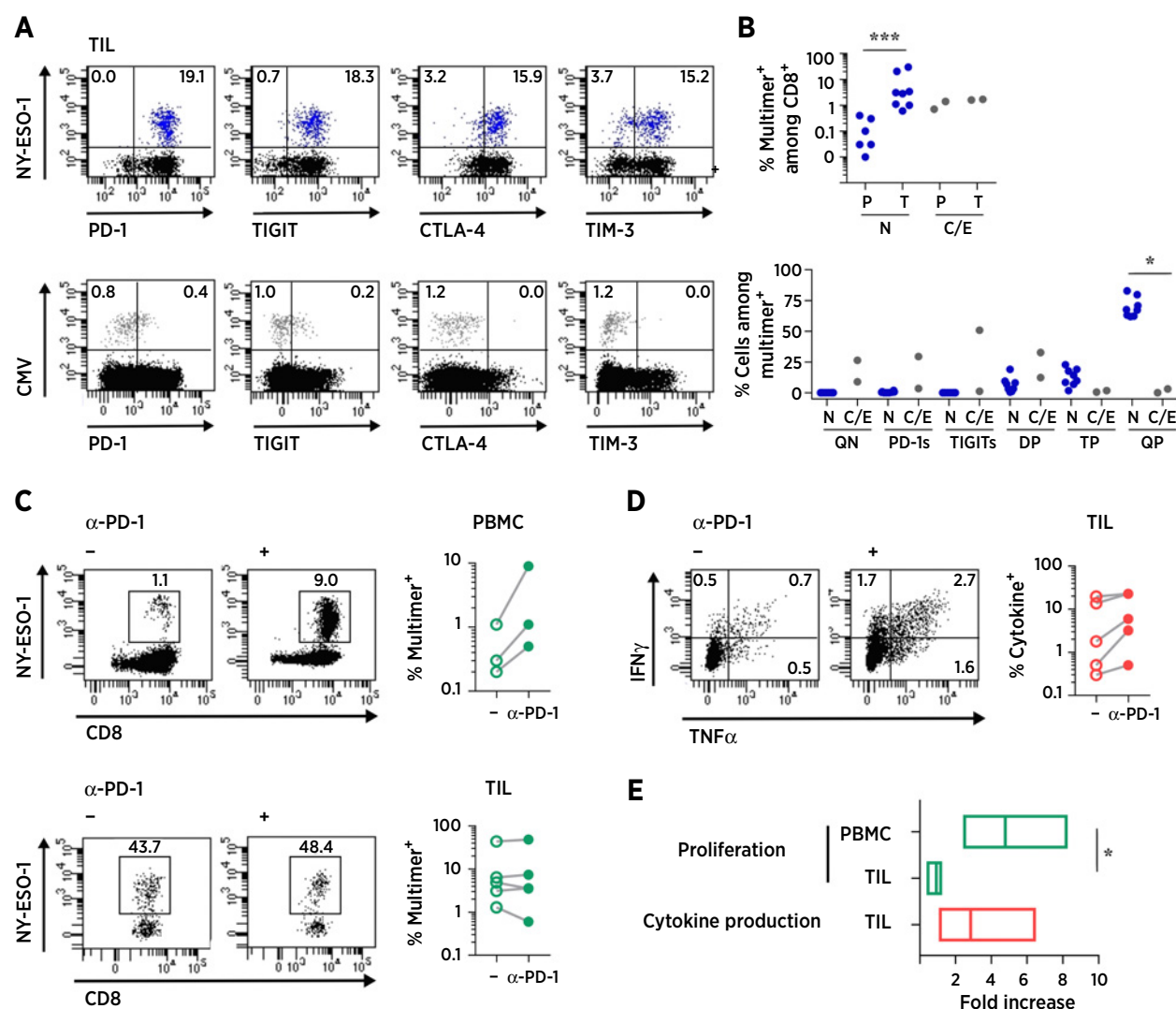


Figure 5.

IC QP cells encompass tumor-specific cells and respond to PD-1 inhibition. **A** and **B**, CD8⁺ TILs were stained *ex vivo* with HLA class I multimers harboring NY-ESO-1, cytomegalovirus (CMV), or Epstein-Barr virus (EBV) epitopes and with mAbs specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3 and analyzed by flow cytometry. **A**, NY-ESO-1 multimer (NY-ESO-1, top) and CMV multimer (CMV, bottom) staining versus PD-1, TIGIT, CTLA-4, and TIM-3 expression gated on CD8⁺ T cells from representative patients with ovarian cancer. NY-ESO-1⁺ cells shown in blue and CMV⁺ in gray. **B**, Summary of the proportions of NY-ESO-1 [N; PBMC (P), ovarian cancer, $n = 6$; TIL (T), ovarian cancer, $n = 8$) and CMV or EBV (C/E; PBMC and TIL: ovarian cancer, $n = 1$, HNC, $n = 1$) multimer⁺ cells among CD8⁺ T cells isolated from PBMCs and TILs (top, 13 independent experiments). Examples of staining of circulating CD8⁺ T cells are shown in Supplementary Fig. S9A. Summary of the proportions of QN, PD-Is, TIGITs, DP, TP, and QP cells among NY-ESO-1 and CMV or EBV multimer⁺ CD8⁺ TILs. NY-ESO-1⁺ cells shown in blue (bottom, four independent experiments). **C** and **E**, CD8⁺ T cells isolated from PBMCs and TILs of NY-ESO-1-seropositive patients with ovarian cancer were stimulated *in vitro* with NY-ESO-1 peptides and autologous CD14⁺ cells in the absence (–) or presence (+) of blocking anti-PD-1. **C**, Day 5 to 7 cultures were stained with NY-ESO-1 multimers and anti-CD8 and analyzed by flow cytometry (seven independent experiments). Representative dot plots (left) and the proportion of multimer⁺ cells among CD8⁺ T cells (right) are shown (top, PBMCs, $n = 3$; bottom, TILs, $n = 5$). Connected points indicate the same patient sample. **D**, Day 7 TIL cultures restimulated with NY-ESO-1 peptides and tested for IFN γ and TNF α production by intracellular cytokine staining (four independent experiments). Representative dot plots (left) and the proportion of cytokine⁺ cells among CD8⁺ T cells in each culture condition (right) are shown ($n = 5$). Connected points indicate the same patient sample. **E**, Floating bars (min to max) represent fold increase in the proportion of multimer⁺ cells (proliferation) and of cytokine⁺ cells in CD8⁺ T cells stimulated in presence of anti-PD-1 compared with those stimulated in absence of anti-PD-1. P values were calculated using Mann-Whitney test (**B**) and unpaired t test (**E**; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$).

patients with serologic responses to the antigen, indicative of an ongoing T-cell response (29). We used HLA class I/NY-ESO-1 fluorescent multimers to detect antigen-specific T cells in these patients. The proportion of antigen-specific T cells was higher in CD8⁺ cells isolated from TILs than from PBMCs, suggesting that they were preferentially attracted, proliferated, and/or were retained at tumor

sites (Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S9A). Similar proportions of CD8⁺ T cells specific for chronic viruses were detected in PBMCs and TILs (Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S9A), further confirming the specific *in situ* accumulation of tumor-specific T cells. NY-ESO-1-specific T cells in the periphery expressed PD-1 and TIGIT, both with intermediate MFIs, whereas they had a QP phenotype at the tumor site

(Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S9). In contrast, bystander virus-specific T cells never acquired the QP phenotype at the tumor site (Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S9). NY-ESO-1-specific CD8⁺ TILs were CD103⁺ and CD39⁺ (Supplementary Fig. S10A). Altogether, these data demonstrated that acquisition of the QP phenotype results from T-cell stimulation in the tumor microenvironment and inferred that the QP population is solely composed of tumor-specific T cells. This is consistent with the high expression of *MKI67*, encoding Ki-67, in QP clusters (Fig. 3B).

Significantly fewer CD28⁺ cells among NY-ESO-1-specific T cells from TILs was seen versus PBMCs (Supplementary Fig. S10B). Antigen-specific T cells were CD28⁺PD-1^{int} in PBMCs and CD28^{+/−}PD-1^{hi} at the tumor site. To examine the functional consequences of these opposite phenotypes, we stimulated circulating and tumor-infiltrating CD8⁺ T cells from NY-ESO-1 seropositive patients with NY-ESO-1 peptides in the absence or presence of blocking PD-1 mAb. Whereas PD-1 blockade led to enhanced growth of antigen-specific T cells from PBMCs, no effect was observed on the proliferation of antigen-specific T cells from TILs (Fig. 5C). PD-1 inhibition was not, however, ineffective at the tumor site, as it led to increased production of effector cytokines by antigen-specific T cells (Fig. 5D and E).

IC-positive CD8⁺ T cells predict clinical response to PD-1/PD-L1 blockade

Using quantitative multiplex IHC (30, 31), we assessed QP cells in pretreatment tumor samples from a cohort of 30 patients with metastatic or recurrent head and neck squamous cell carcinoma treated with ICB targeting the PD-1/PD-L1 axis. The proportion of CD8⁺ or QP TILs was then correlated to response to therapy and OS. Because TIM-3 was the final checkpoint acquired at the tumor site, we used it as a surrogate marker of the QP population. Examples of staining obtained in samples exhibiting a high or low TIM-3⁺CD8⁺ T-cell infiltrate are shown in Fig. 6A (top and bottom, respectively). Quantification of QP (0.03%–15.98% of all nuclei, median = 1.9) and total CD8⁺ (0.15%–23.49% of all nuclei, median = 5.57) TILs showed that their proportion was variable among patients. A correlation was observed between the CD8⁺ infiltrate and response to therapy, although it did not reach statistical significance (Fig. 6B). Infiltration by QP cells significantly correlated with response to therapy and OS (Fig. 6B and C), whereas the total CD8⁺ infiltrate did not significantly correlate with OS (Fig. 6C). The median survival of patients in the high- and low-CD8⁺ T-cell groups was 12.7 and 8.8 months, respectively. Median survival of patients with low QP infiltrate was 5.8 months, whereas that of patients with high QP infiltrate was not reached. These results corroborate the major contribution of QP cells to antitumor immunity.

Discussion

Our results put forward T-cell exhaustion as an indicator of spontaneous adaptive immune response to tumors and, as such, as a biomarker of response to ICB. We showed that exhaustion was acquired at the tumor site through the sequential expression of ICs solely in tumor antigen-specific T cells but not in bystander T cells. Specific cells additionally acquire Trm markers and CXCR6, allowing for their *in situ* residency. We also showed that exhausted Trm-like cells were endowed with high cytotoxic and functional potential but have lost, for a large part, CD28 and TCF-1 expression. PD-1 blockade could revert functional exhaustion of tumor antigen-specific CD8⁺ TILs *in vitro*, while it enhanced proliferation of their circulating CD28⁺ counterparts. Their tumor specificity, high functional poten-

tial, and sensitivity to PD-1 blockade supported their contribution to responsiveness to ICB *in vivo*, which was inferred by the correlation between the proportion of exhausted CD8⁺ TILs and response to therapy and survival following ICB.

On the basis of murine models of chronic infection, exhausted T cells are proposed as a lineage of CD8⁺ T cells distinct from memory T cells (4, 5). Our results showed that circulating tumor antigen-specific CD8⁺ T cells were memory CD28⁺ cells. These cells, like nonexhausted memory circulating PD-1⁺CD8⁺ T cells from healthy individuals (40), expressed lower PD-1 compared with their tumor-infiltrating counterparts. Accordingly, circulating tumor-specific T cells, which did not express TIM-3 or CTLA-4, could substantially expand *in vitro* upon antigen stimulation, which was enhanced in the presence of anti-PD-1. Murine models of exhaustion in cancer, largely relying on implantable syngeneic tumor cell lines, have quicker kinetics than human cancers. In one such model, transcription factors PRDM1 and c-MAF are proposed to coordinate a coinhibitory gene module leading to the concomitant coexpression of several ICs (41). In agreement with these data, we showed that PRDM1 was more expressed in exhausted Trm-like cells. However, our results argue in favor of a progressive acquisition of exhaustion with sequential gain of ICs accompanied by that of Trm markers. This is in agreement with the model that established degrees of exhaustion severity (21), where the transcription factor TOX is associated to exhaustion. Our data showed expression of TOX in QP cells and sequential gain of TOX expression at the tumor site. A study has shown, in a murine model of chimeric antigen receptor T-cell transfer, that transferred T cells acquire an exhausted state at the tumor site through TOX- and TOX2-dependent mechanisms (42).

Seminal work shows that CD8⁺ TILs express Trm markers and that CD103 is involved both in T-cell retention at the tumor site and in tumor recognition (10, 11). Another study shows that the ectonucleotidase CD39 is expressed in a subpopulation of CD103⁺CD8⁺ T cells enriched for tumor specificity (20). In agreement with these studies, we showed that Trm markers and CD39 expression is gained along the sequential acquisition of ICs and that they had high expression in antigen-specific T cells. We also showed that exhausted cells exhibited lower S1PR1 expression, consistent with their *in situ* retention, and expressed the chemokine receptor CXCR6. CXCR6 is expressed in liver Trm cells (43), and its ligand, CXCL16, which can be produced in soluble and membrane-bound forms (44), is expressed by tumor cells of different histologic types and is associated with increased tumor T-cell infiltration (45). We propose that CXCR6 expression in exhausted Trm-like cells facilitates their migration toward and their interaction with tumor cells.

We showed that TGFβ, involved in the induction of CD103 (9) as well as in high PD-1 expression (34), could also be implicated in CD28 loss. To our knowledge, this is not a function that has been attributed to TGFβ, although it is consistent with its immune-suppressive role. Expression of SOX-4 and CXCL13 in the QP population further supported the involvement of TGFβ in its *in situ* development. Indeed, TGFβ induces SOX-4 (36, 37), which mediates CXCL13 production by CD4⁺ T cells (37). CXCL13 has been involved in tertiary lymphoid structure (TLS) induction in inflammatory diseases (37), and its expression by tumor-infiltrating CD8⁺ T cells associates with high B-cell recruitment and TLSs (46, 47).

PD-L1 expression in peripheral tissues and the ability of PD-1–recruited SHP2 to dephosphorylate proteins involved in proximal TCR signaling implies a central role of PD-1 in blocking functions of effector T cells (13, 14). Studies show that PD-1 signaling inhibits CD28 more efficiently compared with TCR proximal signaling molecules (15), and,

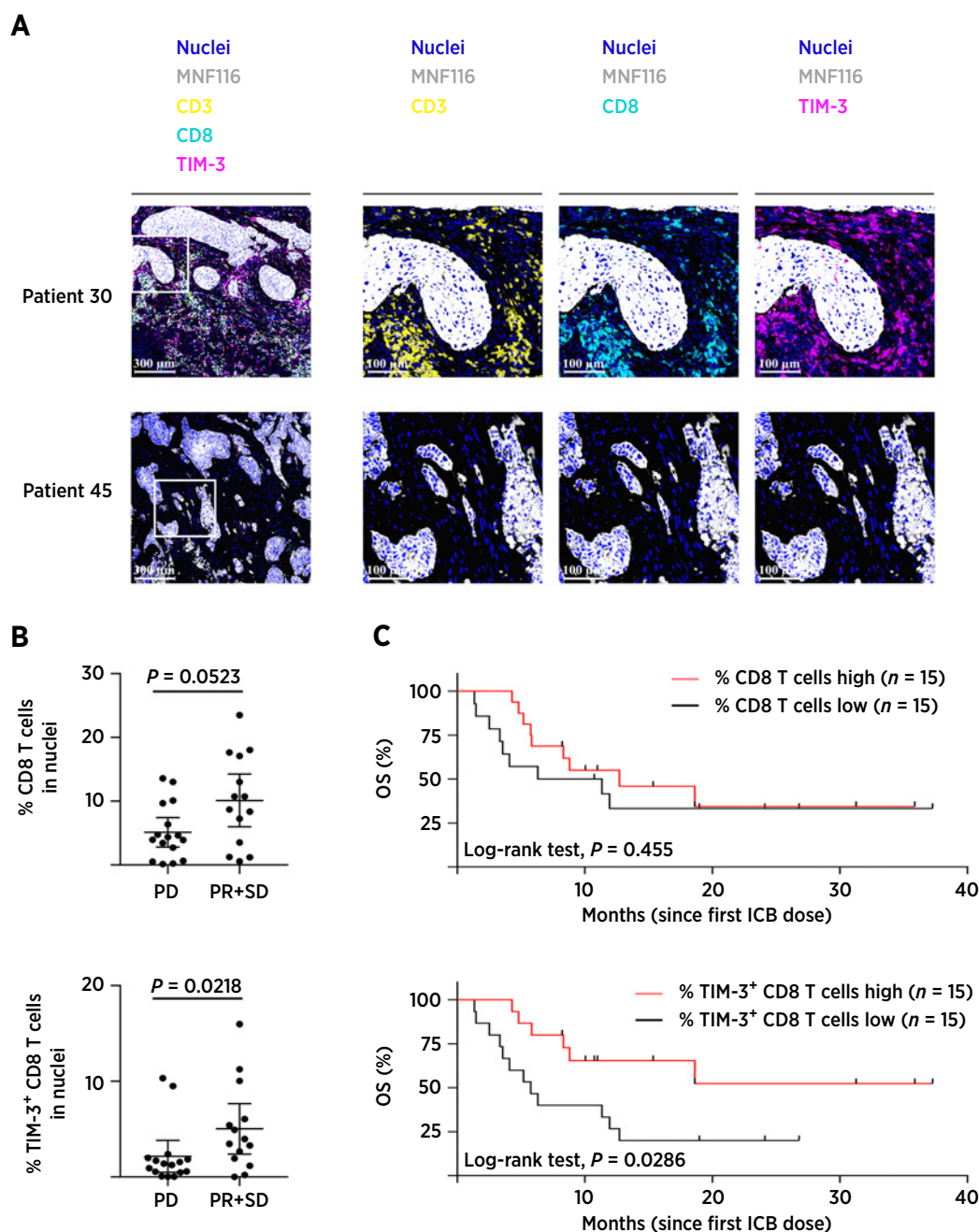


Figure 6.

IC-positive Trm-like exhausted CD8 T cells predict response to PD-1/PD-L1 blockade and survival in HNC. Proportion of CD8⁺ T cells and TIM-3⁺CD8⁺ T cells were determined using quantitative multiplex IHC in pretreatment tumor samples from 30 patients with HNC receiving anti-PD-1/PD-L1 and were correlated to clinical outcome. **A**, Representative images showing CD3 (yellow), CD8 (cyan), TIM-3 (magenta), and MNF116 (gray), as well as nuclei (blue) in two representative tumors with high (patient 30) and low (patient 45) QP infiltrate (left). Zoomed images at 3 \times magnification (from boxed area in left image) are shown for the indicated markers (right). **B**, Frequency of CD8⁺ T cells (top) and TIM-3⁺ CD8 T cells (bottom) among all nuclei in patients with PD ($n = 16$) and patients with PR ($n = 6$) or SD ($n = 8$). **C**, Kaplan-Meier curves of OS by high versus low frequency of total CD8⁺ T cells (top, cutoff at median = 5.57%) or TIM-3⁺ CD8⁺ T cells (bottom, cutoff at median = 1.9%) among all nucleated cells. P values were determined with the Mann-Whitney test (**B**); comparison of survival curves was determined with the log-rank test (**C**).

accordingly, early proliferation of circulating PD-1⁺CD28⁺CD8⁺ T cells could be associated to response to ICB in patients with non-small cell lung cancer (16, 17). We showed significant CD28 loss, specifically in exhausted tumor-specific CD8⁺ TILs. However, circulating antigen-

specific T cells were mostly CD28⁺. Our functional analyses showed that *in vitro* PD-1 inhibition differentially modulated proliferation and effector functions in circulating and tumor-infiltrating antigen-specific T cells. These results are in agreement with previous

studies (15–17) and could imply that low PD-1 expression in circulating antigen-specific T cells will preferentially affect CD28 signaling, whereas overexpression of PD-1 in exhausted Trm-like cells allows for inhibition of TCR signaling in addition to CD28. It is noteworthy that, in a reconstituted membrane *in vitro* setting, PD-1-mediated dephosphorylation of CD28 occurs at low PD-1 densities, whereas TCR signaling molecule dephosphorylation requires a higher density of PD-1 molecules (15), which could correspond to PD-1 densities found in PD-1^{hi} exhausted T cells.

Finally, in agreement with their tumor specificity and high cytotoxic and effector potential, exhausted Trm-like T cells were predictive of response to ICB and survival in a cohort of patients with HNC. These results may contradict studies suggesting that TCF-1⁺CD8⁺ TILs, termed progenitor exhausted cells, are potential players in PD-1/PD-L1 blockade *in vivo* efficacy (48–51). However, these studies largely rely on murine models whereby the degree of exhaustion attained in few weeks is not necessarily comparable with that found in patients. One study shows that TCF-1 expression in tumor antigen-specific T cells in patients is detected in only a low proportion (~1%) of circulating antigen-specific cells (51). Another study shows that the proportion of TCF-1⁺ cells does not correlate with response to therapy but does correlate with survival in responder patients only (48). Another report found that the ratio between TCF-1⁺ and TCF-1[−] cells, rather than the proportion of positive cells, correlates to clinical responses (49). In our study, *TCF7* mRNA and TCF-1 protein were only detected in non-QP cells at the tumor site. Our results showed significant correlation between TIM-3⁺CD8⁺ T cells, which did not express TCF-1, and both response to therapy and OS following ICB. These results do not exclude a potentially important role of TCF-1⁺ tumor-specific CD8⁺ T cells in mediating response to therapy. We believe that the presence of TIM-3⁺CD8⁺ T cells is a direct indicator, that is, biomarker, of a spontaneous adaptive response to the tumor that can be mobilized by ICB. Altogether, our results imply that the combination of proliferation/reinvigoration of circulating memory T cells, that will replenish the tumor site, combined to reversion of exhaustion, even temporary (6), at the tumor site contribute to PD-1/PD-L1-mediated tumor control.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

C. Gomez-Roca reports receiving a commercial research grant from Bristol-Myers Squibb; reports receiving speakers bureau honoraria from Bristol-Myers Squibb, Hoffmann-La Roche; and Pierre Fabre; and is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb. S. Motton is a consultant for Intuitive Surgical. J.-P. Delord

reports receiving speakers bureau honoraria from Roche, MSD, Bristol-Myers Squibb, and AstraZeneca. P. Rochaix reports receiving other commercial research support from Roche Diagnostic/Ventana and MSD. M. Ayyoub reports receiving a commercial research grant from Roche/Genentech (imCORE), reports receiving speakers bureau honoraria from AstraZeneca and Bristol-Myers Squibb, and is a consultant/advisory board member for AstraZeneca and Pierre Fabre. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: C.-C. Balança, C.-M. Scarlata, M. Michelas, C. Devaud, V. Sarraadin, J.-P. Delord, M. Ayyoub
Development of methodology: V. Sarraadin, C. Martinez Gomez, M. Tosolini, F. Pont
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): C.-C. Balança, C.-M. Scarlata, M. Michelas, C. Devaud, V. Sarraadin, C. Franchet, C. Martinez Gomez, C. Gomez-Roca, D. Heaugwane, F. Lauzéral-Vizcaino, L. Mir-Mesnier, V. Féliu, C. Valle, G. Ferron, L. Gladieff, S. Motton, Y. Tanguy Le Gac, A. Dupret-Bories, J. Sarini, B. Vairel, C. Illac, A. Siegfried-Vergnon, E. Mery, S. Vergez, J.-P. Delord, P. Rochaix
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): C.-C. Balança, C.-M. Scarlata, M. Michelas, C. Devaud, V. Sarraadin, C. Franchet, M. Tosolini, D. Heaugwane, F. Lauzéral-Vizcaino, L. Mir-Mesnier, V. Féliu, F. Pont, J.-J. Fournié, M. Ayyoub
Writing, review, and/or revision of the manuscript: C.-C. Balança, C.-M. Scarlata, M. Michelas, V. Sarraadin, C. Franchet, C. Martinez Gomez, G. Ferron, L. Gladieff, J.-P. Delord, A. Martinez, M. Ayyoub
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Martinez Gomez
Study supervision: A. Martinez, M. Ayyoub

Acknowledgments

The study was supported by the Cancer Research Institute, by the Ludwig Institute for Cancer Research, and by MSDAVENIR. The authors are sincerely grateful to patients for their participation in the study. The authors thank Prof. B. Ségué, Dr. C. Colacios, Dr. L. Martinet, and Dr. S. Valitutti, CRCT, for fruitful discussions; Dr. T. Filleron, IUCT-O, for his recommendations regarding statistical analyses; Dr. F.-X. Frenois and IUCT-O ImagIN platform for sequential slides digitalization; IUCT nurses and support staff for their help in clinical research; and Mrs. M.-H. Laloux, CRCT, for logistic support. This work was granted access to the HPC resources of CALMIP supercomputing center under the allocation 2019-T19001 and P19043. The authors also thank the Genotoul Bioinformatics Platform for providing computing resources.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 29, 2019; revised February 4, 2020; accepted April 9, 2020; published first April 15, 2020.

References

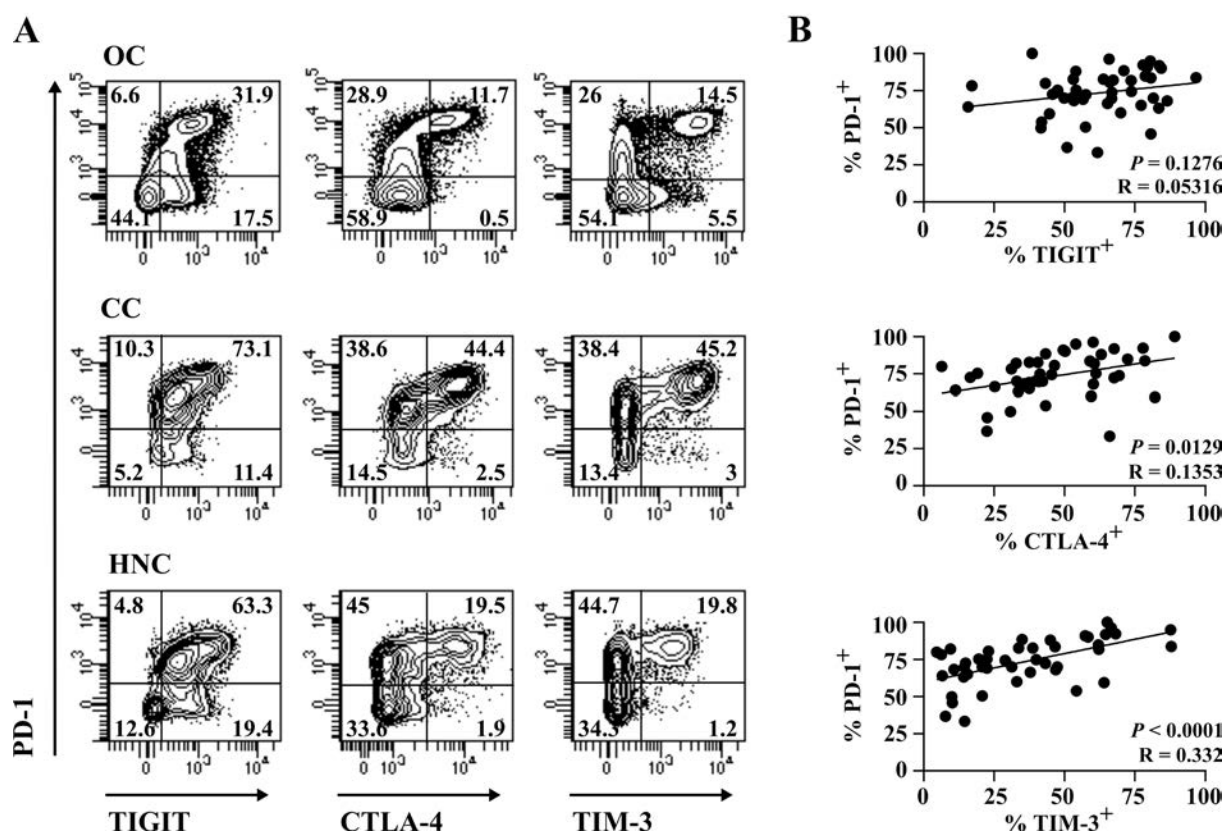
1. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306.
2. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2016;34:539–73.
3. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* 2016;44:989–1004.
4. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol* 2019;37:457–95.
5. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8⁺ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 2012;37:1130–44.
6. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 2016;354:1160–5.
7. Skon CN, Lee J-Y, Anderson KG, Masopust D, Hogquist KA, Jameson SC. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2013;14:1285–93.
8. Cheuk S, Schlums H, Gallais Sérézal I, Martini E, Chiang SC, Marquardt N, et al. CD49a expression defines tissue-resident CD8⁺ T cells poised for cytotoxic function in human skin. *Immunity* 2017;46:287–300.
9. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon M-L, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* 2013;14:1294–301.
10. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, et al. CD8⁺CD103⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 2015;194:3475–86.
11. Franciszkiewicz K, Le Floch A, Jalil A, Vigant F, Robert T, Vergnon I, et al. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res* 2009;69:6249–55.
12. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov* 2018;8:1069–86.

13. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027–34.
14. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 2004;574: 37–41.
15. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 2017;355:1428–33.
16. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 2017;355:1423–7.
17. Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:4993–8.
18. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006;203: 883–95.
19. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, Otterson GA, Gutierrez M, Gainor JF, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 568): outcomes by programmed death ligand 1 and tumor mutational burden as biomarkers. *J Clin Oncol* 2019;37:992–1000.
20. Duhon T, Duhon R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun* 2018;9:2724.
21. Bengsch B, Ohtani T, Khan O, Setty M, Manne S, O'Brien S, et al. Epigenomic-guided mass cytometry profiling reveals disease-specific features of exhausted CD8 T cells. *Immunity* 2018;48:1029–45.
22. Stoekius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* 2017;14:865–8.
23. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, et al. Comprehensive integration of single-cell data. *Cell* 2019;177:1888–902.
24. Herman JS, Sagar null, Grün D. FateID infers cell fate bias in multipotent progenitors from single-cell RNA-seq data. *Nat Methods* 2018;15:379–86.
25. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
26. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from gene ontology and reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 2017;45: D183–9.
27. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D330–8.
28. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:207–10.
29. Redjimi N, Duperrier-Amouriaux K, Raimbaud I, Luescher I, Dojcinovic D, Classe JM, et al. NY-ESO-1-specific circulating CD4+ T cells in ovarian cancer patients are prevalently T(H)1 type cells undetectable in the CD25+ FOXP3+ Treg compartment. *PLoS One* 2011;6:e22845.
30. Glass G, Papin JA, Mandell JW. SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *J Histochem Cytochem* 2009;57:899–905.
31. Blom S, Paavola L, Bychkov D, Turkki R, Mäki-Teeri P, Hemmes A, et al. Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and whole-slide digital image analysis. *Sci Rep* 2017;7:15580.
32. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Touvrey C, Iancu EM, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:4112–9.
33. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Curr Protoc Cytom* 2010;Chapter 10:Unit10.17.
34. Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, Chattergoon MA, Rutebemberwa A, Steigner J, et al. TGFβ1-mediated SMAD3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1366–81.
35. Hu G, Chen J. A genome-wide regulatory network identifies key transcription factors for memory CD8+ T-cell development. *Nat Commun* 2013;4:2830.
36. Kuwahara M, Yamashita M, Shinoda K, Tofukuji S, Onodera A, Shinnakasu R, et al. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF-β and suppresses TH2 differentiation. *Nat Immunol* 2012;13: 778–86.
37. Yoshitomi H, Kobayashi S, Miyagawa-Hayashino A, Okahata A, Doi K, Nishitani K, et al. Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments. *Nat Commun* 2018; 9:3762.
38. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Most R van der Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003;77:4911–27.
39. Bioley G, Guillaume P, Luescher I, Yeh A, Dupont B, Bhardwaj N, et al. HLA class I - associated immunodominance affects CTL responsiveness to an ESO recombinant protein tumor antigen vaccine. *Clin Cancer Res* 2009;15:299–306.
40. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doherty GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 2011;186:4200–12.
41. Chihara N, Madi A, Kondo T, Zhang H, Acharya N, Singer M, et al. Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* 2018;558:454–9.
42. Seo H, Chen J, González-Avalos E, Samaniego-Castruita D, Das A, Wang YH, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8+ T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116: 12410–5.
43. Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2^{high} tissue-resident T cells in the human liver: sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med* 2017;214:1567–80.
44. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000;1:298–304.
45. Hojo S, Koizumi K, Tsuneyama K, Arita Y, Cui Z, Shinohara K, et al. High-level expression of chemokine CXCL16 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Cancer Res* 2007;67:4725–31.
46. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* 2018;24:994–1004.
47. Workel HH, Lubbers JM, Arnold R, Prins TM, van der Vlies P, de Lange K, et al. A transcriptionally distinct CXCL13+CD103+CD8+ T-cell population is associated with B-cell recruitment and neoantigen load in human cancer. *Cancer Immunol Res* 2019;7:784–96.
48. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol* 2019;20:326–36.
49. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, Ray JP, de Boer CG, Jenkins RW, et al. Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma. *Cell* 2018;175:998–1013.
50. Kurtulus S, Madi A, Escobar G, Klapholz M, Nyman J, Christian E, et al. Checkpoint blockade immunotherapy induces dynamic changes in PD-1-CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Immunity* 2019;50:181–94.
51. Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, Fuertes Marraco SA, Calderon-Copete S, Pais Ferreira D, et al. Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy. *Immunity* 2019;50:195–211.

SUPPLEMENTARY DATA

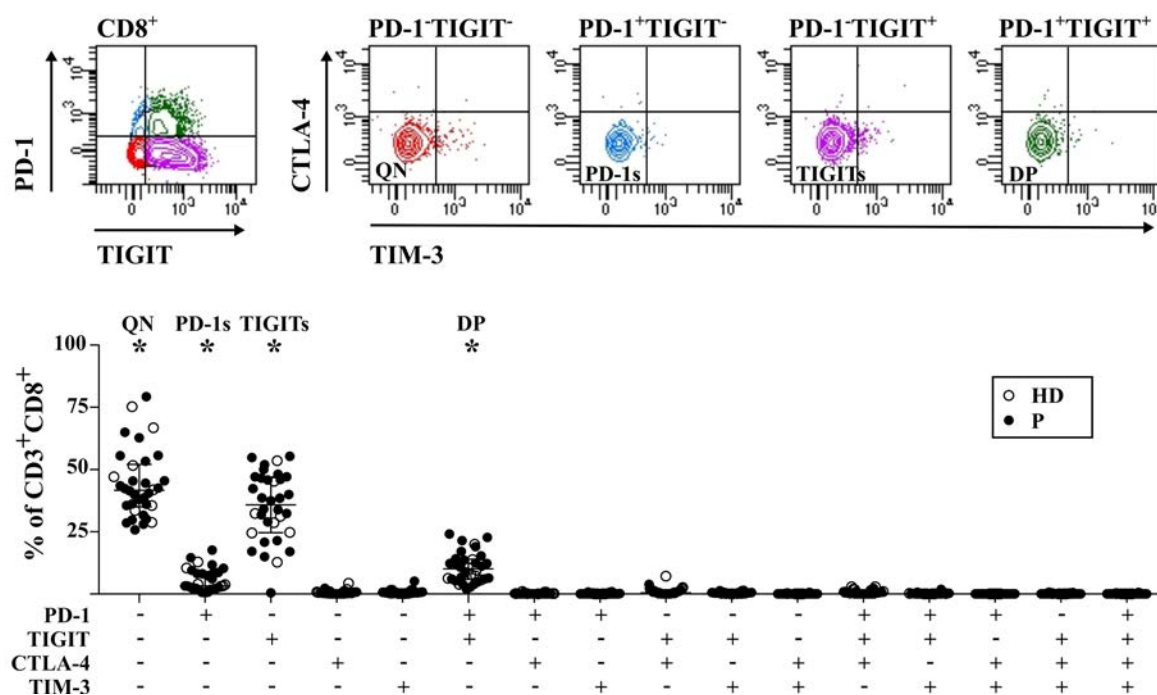
Supplementary Figures

Supplementary figure S1



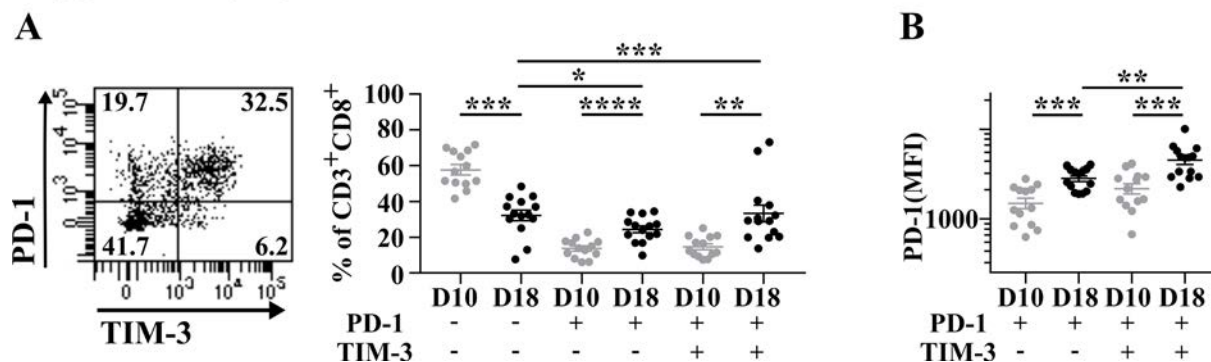
Supplementary figure S1. Co-expression of immune checkpoints within CD8⁺ TIL. **A**, Isolated CD8⁺ TIL or whole tumor specimens single cell suspensions were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled mAb specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 and analyzed by flow cytometry. Examples of contour plots show PD-1 versus TIGIT, CTLA-4 or TIM-3 staining gated on CD3⁺CD8⁺ T cells for the three malignancies. **B**, Correlation between the proportions of PD-1⁺ and those of TIGIT⁺, CTLA-4⁺ or TIM-3⁺ CD8 T cells (OC, $n = 17$; CC, $n = 12$; HNC, $n = 15$). Pearson correlation was used to compare variables.

Supplementary figure S2



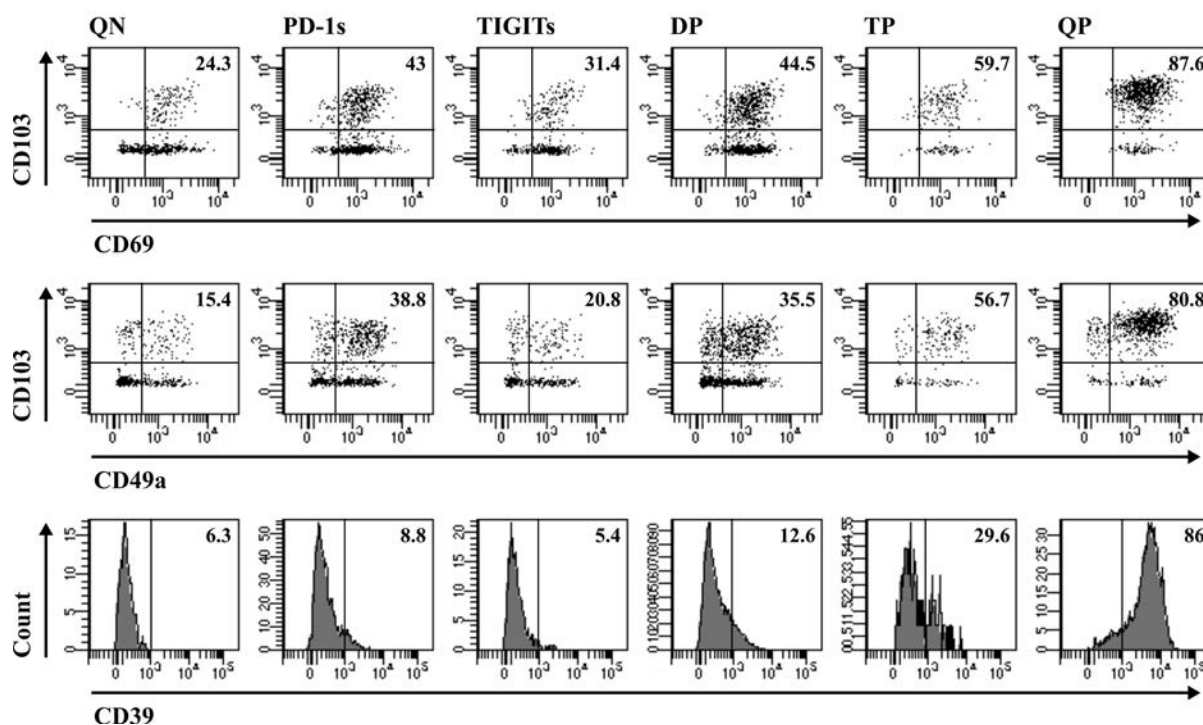
Supplementary figure S2. Contour plots, showing CTLA-4 and TIM-3 expression, are gated on PD-1⁻TIGIT⁻, PD-1⁺TIGIT⁻, PD-1⁻TIGIT⁺ and PD-1⁺TIGIT⁺ populations as shown in the left contour plot. Data corresponding to the proportion of each of the 16 combinations of IC expression are summarized for healthy donors (HD) and patients (P) (HD, $n = 8$; OC, $n = 10$; CC, $n = 8$; HNC, $n = 8$). Median proportions, among CD8⁺ TIL, for four subpopulations (*) was > 5%: PD-1⁻TIGIT⁻CTLA-4⁻TIM-3⁻ (quadruple negative, QN); PD-1⁺TIGIT⁻CTLA-4⁻TIM-3⁻ (PD-1 single, PD-1s); PD-1⁻TIGIT⁺CTLA-4⁻TIM-3⁻ (TIGIT single, TIGITs), PD-1⁺TIGIT⁺CTLA-4⁻TIM-3⁻ (double positive, DP).

Supplementary figure S3



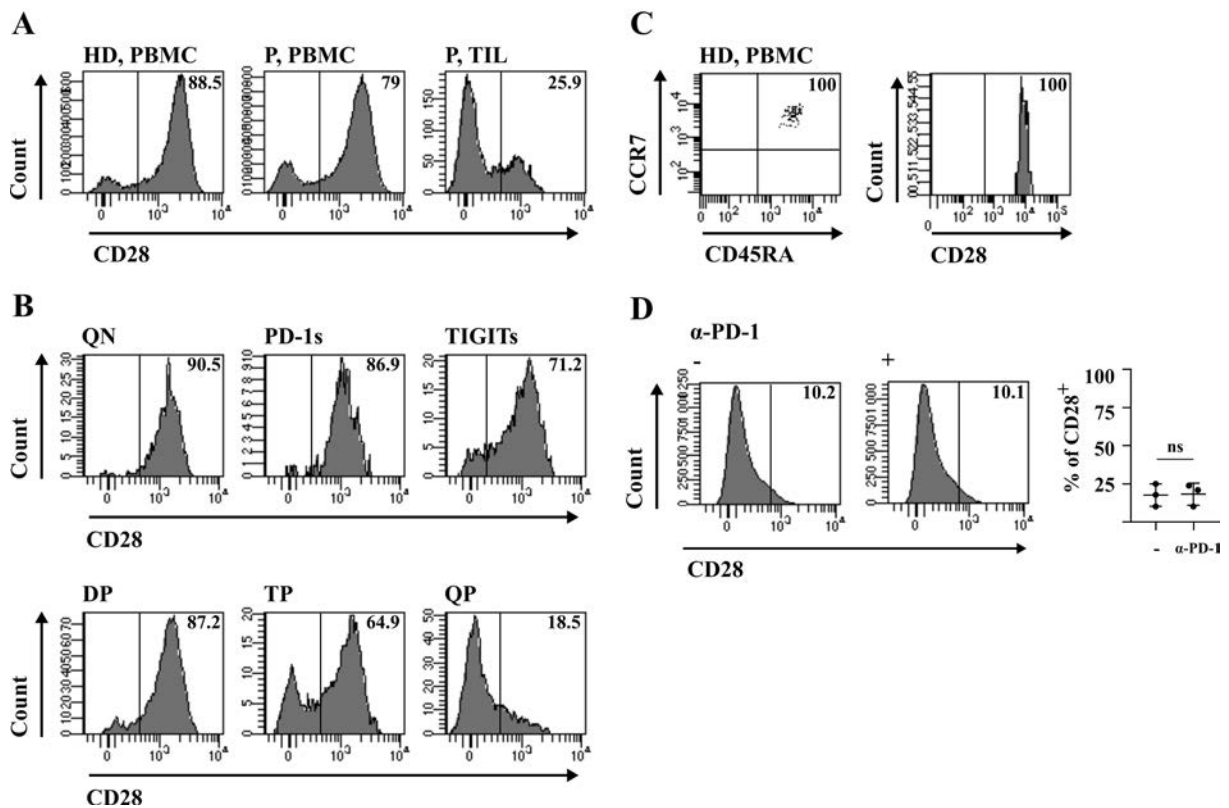
Supplementary figure S3. Time-dependent increase of PD-1 expression levels in CD8 TIL infiltrating murine HNC. Expression of PD-1 and TIM-3 in CD8 TIL was analyzed, using flow cytometry, in day (D)10 ($n = 13$) and D18 ($n = 14$) tumors from a TC1-based oral tumor model. **A**, D18 representative dot plot (gated on CD45.2⁺CD3⁺CD8⁺ cells) and summary of the percentage of cells expressing no checkpoints (-/-), PD-1 alone (+/-) or co-expressing PD-1 and TIM-3 (+/+) in D10 and D18 tumors. **B**, MFI of PD-1 staining in CD8 T cells expressing PD-1 alone or co-expressing PD-1 and TIM-3 is depicted for D10 and D18 tumors. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. P values were determined using the unpaired t test.

Supplementary figure S4



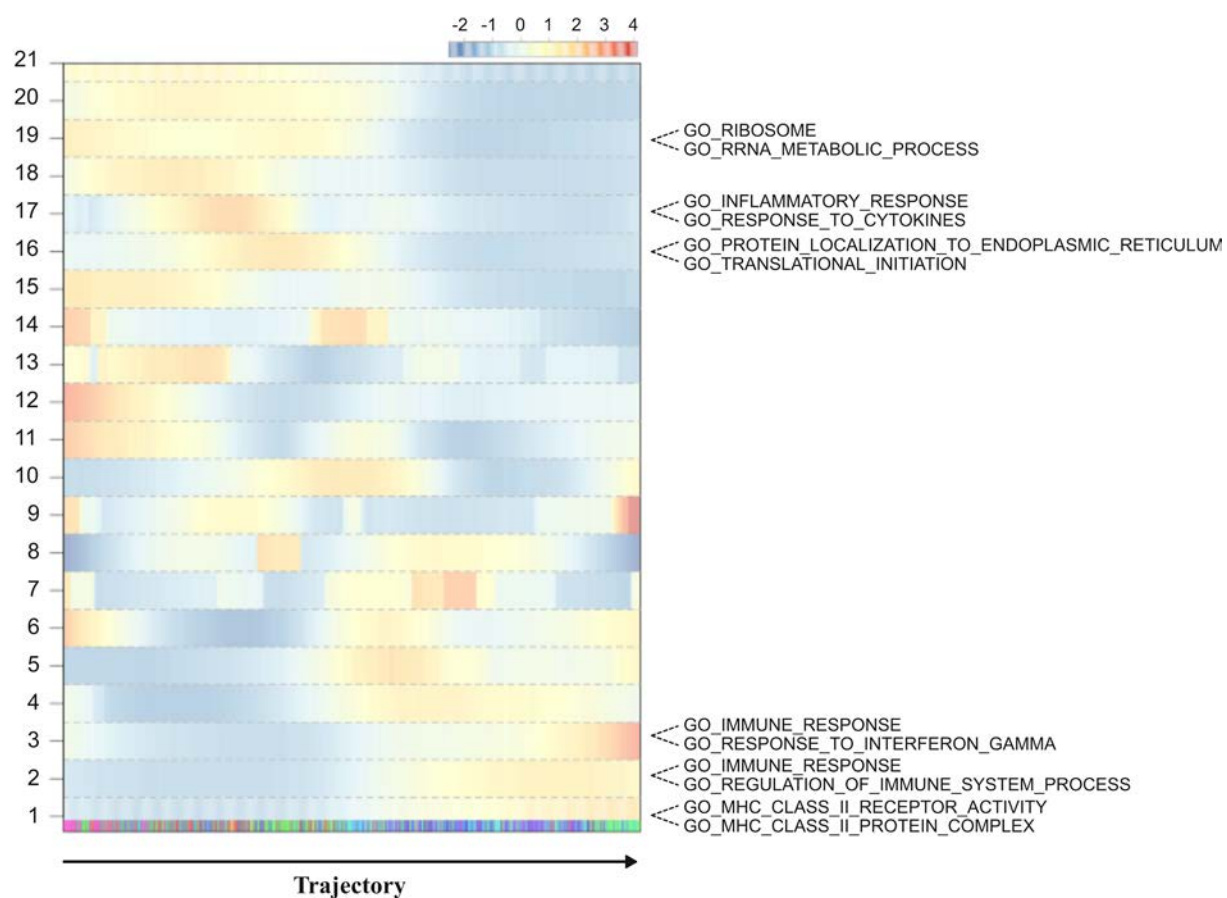
Supplementary figure S4. Trm markers and CD39 expression within CD8⁺ TIL subpopulations. Isolated CD8⁺ TIL or whole tumor specimens single cell suspensions were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled mAb specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3, CD103, CD69, CD49a and CD39 and analyzed by flow cytometry. Dot plots, showing CD103 versus CD69 (upper panels) and CD103 versus CD49a (middle panels) and histogram plots showing CD39 expression, are gated on the 6 CD8⁺ TIL subpopulations defined as in Fig. 1B.

Supplementary figure S5



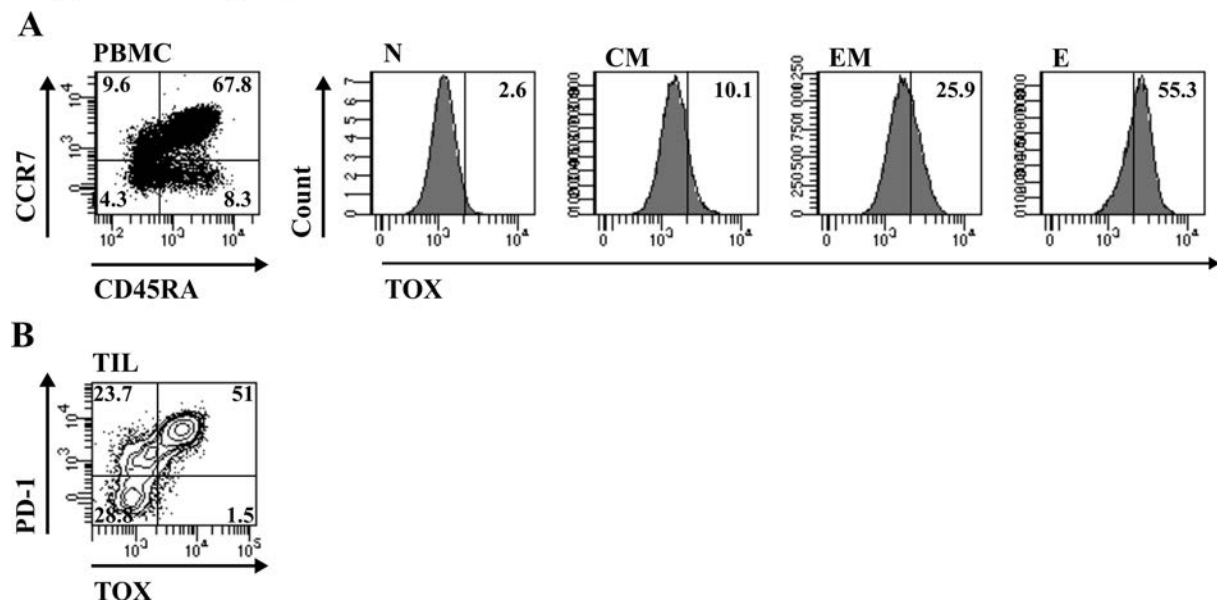
Supplementary figure S5. Expression of CD28 in PBMC and in TIL. **A**, Histograms show expression of CD28 gated on EM (CD45RA⁻CCR7⁻) CD8 T cells from PBMC of 1 HD and 1 patient (P) as well as TIL from 1 patient. **B**, Histograms show expression of CD28 in the six CD8⁺ TIL subpopulations defined as in Fig. 1B. **C**, Reanalysis of sorted naïve CD8⁺ T cells was performed by flow cytometry. Naïve cells were CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺. **D**, CD28⁻ cells were sorted from TGF- β cultures obtained as in Fig. 2F without CFSE staining. Histograms show expression of CD28 in sorted cells re-stimulated in the absence (-) or presence (+) of anti-PD-1 mAb for 7 days ($n = 3$ HD). ns = not significant. Wilcoxon test was used to compare variables.

Supplementary figure S6



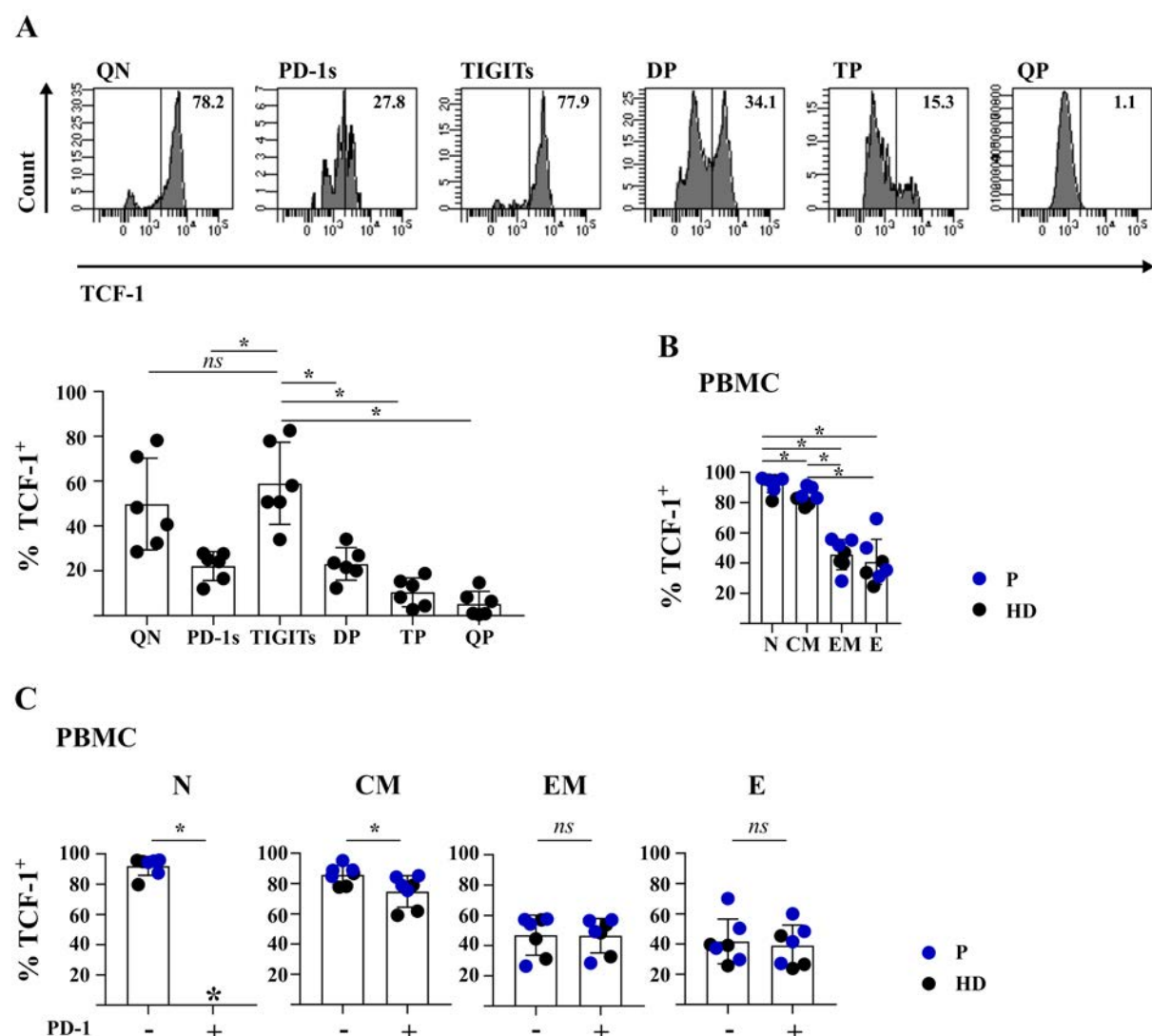
Supplementary figure S6. FateID heatmap for gene nodes. Pseudotime analysis of scRNA-Seq data; Gene ontology (GO) enrichment analysis based on C5 collection is shown in the FateID heatmap for gene nodes. Significant pathways found in nodes 1-3, 16, 17 and 19 are shown.

Supplementary figure S7



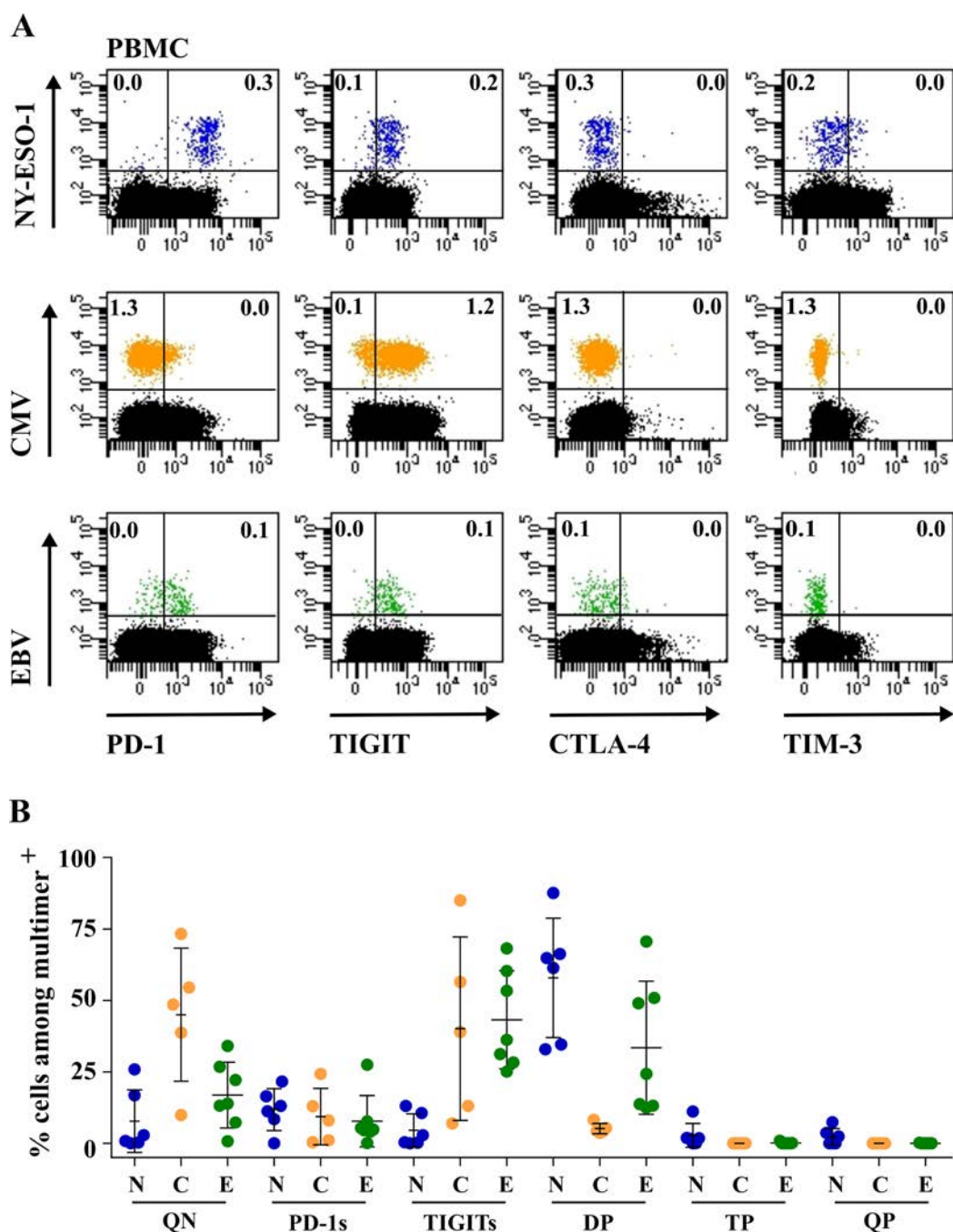
Supplementary figure S7. Expression of TOX in PBMC and in TIL. **A**, CD8 T-cell differentiation stage was determined based on CD45RA and CCR7 expression (dot plot). Histograms show TOX expression gated on naïve (N, CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CM, CD45RA⁺CCR7⁺), effector memory (EM, CD45RA⁺CCR7⁺) and effector (E, CD45RA⁺CCR7⁺) circulating CD8 T cells. **B**, Contour plot depicting PD-1 versus TOX expression in CD8⁺ TIL (representative patient).

Supplementary Figure S8



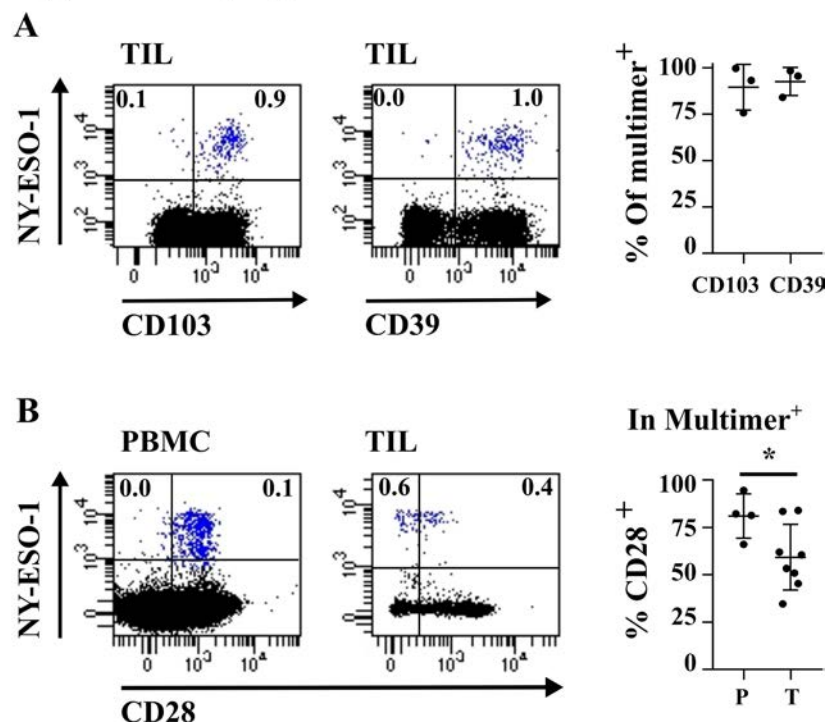
Supplementary Figure S8. TCF-1 expression in PBMC and TIL. **A**, Example of histogram plots depicting TCF-1 expression in the 6 CD8⁺ TIL subpopulations based on IC expression for 1 patient is shown. Proportions of TCF-1⁺ cells are summarized for 6 patients. **B-C**, Isolated CD8⁺ cells from PBMC of healthy donors (HD, $n = 3$) and cancer patients (P, $n = 4$) were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled mAb specific for CD3, CD8, CCR7, CD45RA, PD-1 and TCF-1 and analyzed by flow cytometry. **B**, Proportions of TCF-1⁺ cells in naïve (N, CCR7⁺CD45RA⁺), central memory (CM, CCR7⁺CD45RA⁻), effector memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁻) and effector (E, CCR7⁻CD45RA⁺) populations are summarized. **C**, Proportions of TCF-1⁺ cells in PD-1 positive and negative N, CM, EM and E CD8⁺ T-cell populations are summarized. *, $P < 0.05$; ns = not significant. P values were calculated using Wilcoxon test.

Supplementary figure S9



Supplementary figure S9. *Ex vivo* phenotyping of circulating NY-ESO-1-, CMV- and EBV-specific CD8 T cells. PBMC were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled HLA class I multimers harboring NY-ESO-1, CMV and EBV epitopes and with mAb specific for CD3, CD8, PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 and analyzed by flow cytometry. **A**, Dot plots show HLA-I/NY-ESO-1, HLA-I/CMV and HLA-I/EBV multimers versus PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 staining in CD8 T cells isolated from patients PBMC. **B**, Summary of the proportions of QN, PD-1s, TIGITs, DP, TP and QP cells among NY-ESO-1 (N) ($n = 6$), CMV (C) ($n = 5$) or EBV (E) ($n = 7$) multimer⁺ CD8⁺ T cells.

Supplementary figure S10



Supplementary figure S10. CD103, CD39 and CD28 expression in NY-ESO-1-specific CD8 T cells. **A**, CD8⁺ cells isolated from TIL were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled HLA class I multimers harboring NY-ESO-1 epitopes and with mAb specific for CD3, CD8, CD39 and CD103 and analyzed by flow cytometry. NY-ESO-1 multimer versus CD103 and CD39 staining gated on CD3⁺CD8⁺ cells is shown for one representative OC patient. Proportions of cells expressing CD103 or CD39 among NY-ESO-1-specific CD8 T cells are summarized ($n = 3$). **B**, CD8⁺ cells isolated from PBMC and TIL were stained *ex vivo* with fluorochrome-labeled HLA class I multimers harboring NY-ESO-1 epitopes and with mAb specific for CD3, CD8 and CD28 and analyzed by flow cytometry. NY-ESO-1-multimer versus CD28 staining in CD8 T cells is shown for 1 PBMC and 1 TIL. Proportions of CD28⁺ cells among NY-ESO-1-specific CD8 T cells are summarized (PBMC; P, $n = 4$; TIL; T, $n = 8$). *, $P < 0.05$. P value was calculated using the unpaired t-test.

Supplementary Tables**Supplementary table S1. List of flow cytometry antibodies**

Antibody	Clone	Catalog number	Manufacturer	RRID
Anti-human				
CD3	UCH-T1	563851	BD	AB_2744391
CD3	UCH-T1	555332	BD	AB_395739
CD4	RPA-T4	564724	BD	AB_2738917
CD8	RPA-T8	560774	BD	AB_1937325
CD8	RPA-T8	301046	Biolegend	AB_2563264
CD45RA	HI100	11-0458-42	eBioscience	AB_11219672
CD197 (CCR7)	-	130-108-288	Miltenyi	AB_2655960
PD-1	EH12.1	565299	BD	AB_2739167
TIGIT	MBSA43	25-9500-42	eBioscience	AB_2573547
CD366 (TIM-3)	7D3	565562	BD	AB_2744369
CD28	CD28.2	559770	BD	AB_398666
CD103	BER-ACT8	550259	BD	AB_393563
CD69	FN50	560737	BD	AB_1727508
CD49a	SR84	559596	BD	AB_397288
CD39	TU66	563681	BD	AB_2738370
CD152 (CTLA-4)	BNI3	563931	BD	AB_2738491
Granzyme-B	GB11	560213	BD	AB_1645453
Perforin	δG9	563576	BD	AB_2738287
TOX	TXRX10	50-6502-82	eBioscience	AB_2574265
CD107a	H4A3	555801	BD	AB_396135
INF γ	B27	557995	BD	AB_396977
TNF α	MAb1	557647	BD	AB_396764
CD107a	H4A3	555801	BD	AB_396135
CD107a	H4A3	560664	BD	AB_1727417
CD63D9 (TCF-1)	C63D9	6709S	Cell signaling technology	Cat #6709
Anti-mouse				
CD8	53-6.7	564297	BD	AB_2722580
CD45.2	104	553772	BD	AB_395041
CD3	145-2C11	564379	BD	AB_2738780
PD-1	J43	744549	BD	AB_2742320
CD366 (TIM-3)	RMT-93	747626	BD	AB_2744192
CD16/CD32	2.4 G2	553142	BD	AB_394657

Supplementary table S2. List of MHC class I/peptide multimers

Peptide	HLA	Multimer type	Catalog number	Manufacturer
NY-ESO-1 ^{157-165A}	A*0201	Dextramer	WB-3247-PE	Immudex
NY-ESO-1 ⁹²⁻¹⁰⁰	B*3501	Dextramer	WK3694-PE	Immudex
NY-ESO-1 ⁹⁴⁻¹⁰²	B*3501	Dextramer	WK2701-PE	Immudex
NY-ESO-1 ⁹⁴⁻¹⁰⁴	B*3501	Dextramer	WK5341-PE	Immudex
NY-ESO-1 ⁹²⁻¹⁰⁰	Cw*0304	Dextramer	WS3694-PE	Immudex
NY-ESO-1 ⁹⁶⁻¹⁰⁴	Cw*0304	Dextramer	WS5342-PE	Immudex
HCMV pp65 ⁴⁹⁵⁻⁵⁰⁴	A*0201	Pentamer	F008-2A-E	Prolimmune
EBV BMLF-1 ²⁵⁹⁻²⁶⁷	A*0201	Pentamer	F001-2A-E	Prolimmune

Supplementary table S3. List of immunohistochemistry antibodies

Antigen	Type	Clone	Manufacturer
TIM-3	Rabbit MAb	2321C	R&D Biosystem
CD3	Rabbit MAb	2GV6	Roche Ventana
CD8	Mouse MAb	C8/144B	Dako Agilent
Pan Keratin	Mouse MAb	MNF116	Abcam

Conclusion

Cette étude montre que l'épuisement des TIL est un indicateur d'une réponse immune spécifique des Ag tumoraux spontanée et peut être utilisé comme biomarqueur de la réponse au blocage de l'axe PD-1/PD-L1.

Nous avons montré que l'épuisement était acquis au site de la tumeur par l'expression séquentielle des PCI et de CD39 et TOX, uniquement par les LT spécifiques des Ag tumoraux, en comparaison aux autres LT infiltrant la tumeur. Les LT spécifiques acquièrent également les marqueurs des Trm et CXCR6, ce qui permet leur résidence *in situ*. Ces TIL Trm épuisés sont dotés d'un potentiel cytotoxique élevé, mais ont perdu l'expression de CD28 et de TCF1. Le blocage de PD-1 *in vitro* peut inverser l'épuisement fonctionnel des TIL CD8 spécifiques de la tumeur, tandis qu'il augmente la prolifération des LT spécifiques des Ag tumoraux qui expriment CD28 en périphérie. Les TIL spécifiques des Ag tumoraux, à fort potentiel cytotoxique et sensibles aux AcM anti-PD-1, contribuent à l'efficacité clinique des inhibiteurs des PCI. En effet, Nous avons montré qu'une proportion élevée de TIL CD8 épuisés dans la tumeur des patients est corrélée à la réponse au traitement et à la survie.

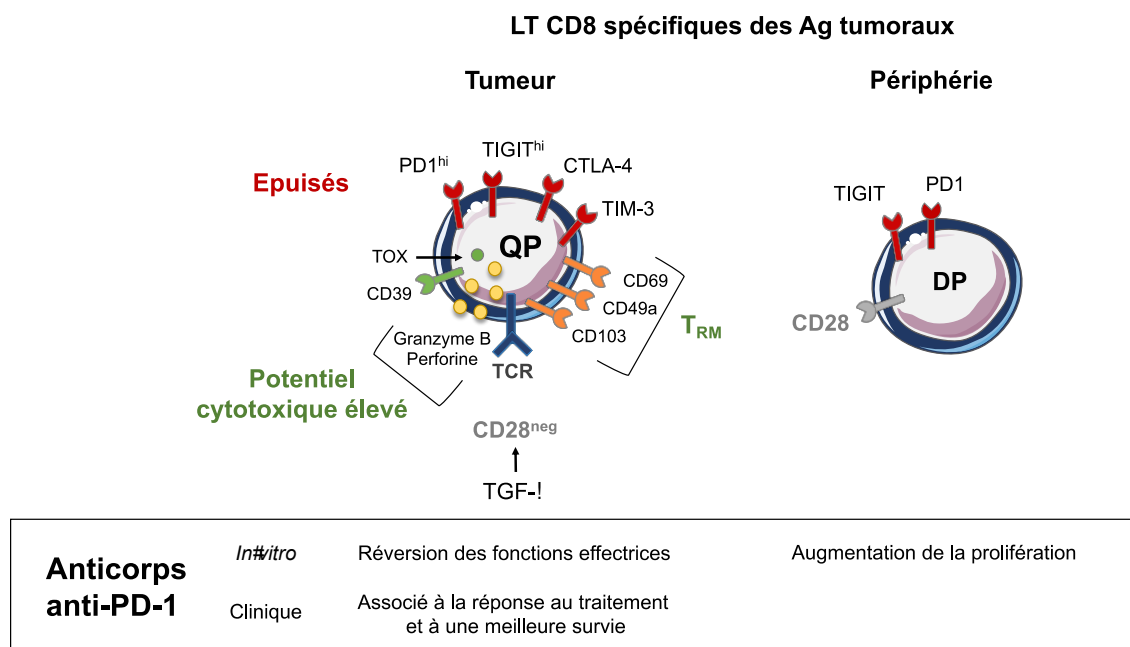


Figure 34 : Caractérisation des LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux chez les patients et analyse de leur contribution à l'efficacité clinique du blocage de l'axe PD-1/PD-L1.

II) Article 2: PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating exhausted PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 T cells

Contexte

Les LT CD4 conventionnels non Treg ont un rôle auxiliaire bien connu dans l'amorçage des LT CD8 au niveau des LN. En effet, ils coopèrent avec les DC via l'interaction CD40/CD40L, permettant l'activation, la différenciation et la prolifération des LT CD8 cytotoxiques. Cependant, leur rôle au site tumoral est nettement moins étudié.

Il a été montré que les TIL CD4 spécifiques des Ag tumoraux s'accumulent au site de la tumeur en comparaison à la périphérie, suggérant leur implication directe ou indirecte dans la phase effectrice de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les TIL CD4 ne reconnaissent pas directement les cellules tumorales puisqu'elles n'expriment pas de molécule du CHM-II. Cependant, il a été montré qu'ils peuvent reconnaître les DC présents au site tumoral. Leur rôle dans l'immunité anti-tumorale *in situ* semble évident, néanmoins, les mécanismes exacts sont encore à identifier.

Une étude récente, dans un modèle murin, montre que les TIL CD4 spécifiques de la tumeur sont nécessaires pour la prolifération et la différenciation des TIL CD8 spécifiques des Ag tumoraux et également pour l'efficacité de l'immunothérapie par AcM anti-PD-1⁷³¹. D'autre part, il a été démontré qu'une communication entre les TIL CD8 et les DC est essentielle pour une réponse efficace au blocage de PD-1⁷³². Ces données chez la souris suggèrent un rôle auxiliaire des TIL CD4 nécessaire dans l'activité effectrice des TIL CD8. De plus, les DC semblent également jouer un rôle important dans l'activation des TIL CD8 lors du blocage de PD-1.

L'étude phénotypique et fonctionnelle des TIL CD4 ainsi que l'analyse de leur contribution à l'efficacité du blocage de PD-1 chez l'homme pourraient permettre d'identifier leur rôle dans l'activation des TIL CD8 et de les définir comme cible thérapeutique potentielle.

PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating, exhausted PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 T cells

Camille-Charlotte Balança,¹ Anna Salvioni,¹ Clara-Maria Scarlata,^{1,2} Marie Michelas,¹ Carlos Martinez-Gomez,^{1,3} Carlos Gomez-Roca,^{1,4} Victor Sarradin,^{1,4} Marie Tosolini,⁵ Carine Valle,⁵ Frédéric Pont,⁵ Gwénaél Ferron,³ Laurence Gladieff,⁴ Sébastien Vergez,^{6,7} Agnès Dupret-Bories,³ Eliane Mery,⁸ Philippe Rochaix,⁸ Jean-Jacques Fournié,¹ Jean-Pierre Delord,^{1,4,7} Christel Devaud,¹ Alejandra Martinez,^{1,3} and Maha Ayyoub^{1,2,7}

¹Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse, France. ²Immune Monitoring Core Facility, ³Department of Surgery, and ⁴Department of Medical Oncology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁵Technological Pole and Bioinformatic Platform, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, Toulouse, France. ⁶Department of Surgery, Centre Hospitalier Universitaire, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France. ⁷Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France. ⁸Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Toulouse, France.

Authorship note: AS, CMS, and MM contributed equally to this work.

Conflict of interest: CGR received a research grant from Bristol-Myers Squibb; received speakers' bureau honoraria from Bristol-Myers Squibb, Hoffmann-La Roche, and Pierre Fabre; and is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb. JPD received speakers' bureau honoraria from Roche, Merck Sharp & Dohme, Bristol-Myers Squibb, and AstraZeneca. PR received research support from Roche Diagnostic/Ventana and MSD. MA received a research grant from Roche/Genentech (imCORE), received speakers' bureau honoraria from AstraZeneca and Bristol-Myers Squibb, and is a consultant/advisory board member for AstraZeneca.

Copyright: © 2021, Balança et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Submitted: July 24, 2020

Accepted: December 9, 2020

Published: December 17, 2020

Reference information: *JCI Insight*. 2021;6(2):e142513.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.142513>

Tumor antigen-specific CD4 T cells accumulate at tumor sites, evoking their involvement in antitumor effector functions in situ. Contrary to CD8 cytotoxic T lymphocyte exhaustion, that of CD4 T cells remains poorly appreciated. Here, using phenotypic, transcriptomic, and functional approaches, we characterized CD4 T cell exhaustion in patients with head and neck, cervical, and ovarian cancer. We identified a CD4 tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) population, defined by high PD-1 and CD39 expression, which contained high proportions of cytokine-producing cells, although the quantity of cytokines produced by these cells was low, evoking an exhausted state. Terminal exhaustion of CD4 TILs was instated regardless of TIM-3 expression, suggesting divergence with CD8 T cell exhaustion. scRNA-Seq and further phenotypic analyses uncovered similarities with the CD8 T cell exhaustion program. In particular, PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TILs expressed the exhaustion transcription factor TOX and the chemokine CXCL13 and were tumor antigen specific. In vitro, PD-1 blockade enhanced CD4 TIL activation, as evidenced by increased CD154 expression and cytokine secretion, leading to improved dendritic cell maturation and consequently higher tumor-specific CD8 T cell proliferation. Our data identify exhausted CD4 TILs as players in responsiveness to immune checkpoint blockade.

Introduction

By virtue of their direct antitumor cytotoxic effector functions, CD8 T cells have been at the core of antitumor immunity investigations. We, and others, have nonetheless shown that circulating CD4 T cells specific for tumor antigens (Ags) are detectable in patients bearing Ag⁺ tumors (1, 2). The contribution of CD4 T cells to CD8 T cell priming, whereby CD4 T cells help foster clonal expansion and acquisition of CD8 T cell memory and effector functions, is generally acknowledged (3). In addition to their foreseeable role at the priming phase and despite the lack of MHC class II molecule expression in the vast majority of tumor cells, CD4 T cells are thought to exert effector functions through for instance IFN- γ secretion (4). We showed that tumor Ag-specific CD4 T cells accumulate at tumor sites, where they are found at higher proportions than in the circulation, supporting their involvement in direct or indirect antitumor effector functions in situ (1, 5). Recently, the presence of tumor-specific CD4 T cells, specifically at the tumor site, was shown to be necessary for immune-mediated tumor rejection (6).

The clinical success of immune checkpoint blockade (ICB) roused interest in understanding T cell exhaustion as a means of developing more potent immunotherapy combinations and identifying biomarkers of response. The study of T cell exhaustion in patients with cancer, mainly focused on CD8 T cells, uncovered exhaustion as a marker of tumor specificity and of response to ICB (7–9). Here, we undertook

the analysis of tumor-infiltrating CD4 T cell exhaustion in patients with cancer and present data positioning exhausted CD4 T cells as players of response to ICB.

Results

Coexpression of high PD-1 and CD39 defined a population of functionally exhausted CD4 TILs. We showed that circulating tumor Ag-specific CD8 T cells in patients with epithelial malignancies express intermediate levels of PD-1 and TIGIT (7). When they infiltrate tumors, they sequentially express CTLA-4 and then TIM-3 and concomitantly upregulate PD-1 and TIGIT, leading to an exhausted population that we named quadruple positive (QP), i.e., expressing the 4 immune checkpoints (ICs) (7). To investigate CD4 T cell exhaustion, because virtually all CD4 tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) do not express CD45RA, we assessed IC expression in memory conventional FOXP3⁺ CD4 T cells (CD4 Tconvs; Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142513DS1>) from TILs of patients with head and neck cancer, cervical cancer, and ovarian cancer (OC). The proportion of cells expressing PD-1 was the highest, followed by that of cells expressing TIGIT, CTLA-4, and then TIM-3 (Supplemental Figure 1B). Comparison of IC expression among tumor types showed that PD-1⁺ cells were detected at higher proportions in OC samples than in head and neck cancer samples (Supplemental Figure 1B). Expression of TIGIT, CTLA-4, and TIM-3 was systematically associated with that of PD-1 (Supplemental Figure 1B), and correlation analyses revealed significant positive correlations between proportions of cells expressing PD-1 and those expressing each of the other ICs (Supplemental Figure 1B). IC coexpression analysis showed that the proportion of QP cells was much lower among CD4 TILs (range, 0.23%–43.81%; median, 3.28%; Supplemental Figure 2A) than CD8 TILs (range, 0.7%–62%; median, 20.69%; ref. 7). In CD8 TILs, we showed that IC accumulation is an indicator of chronic stimulation, whereby the QP population, identified by TIM-3 expression, represents terminally exhausted tumor Ag-specific T cells (7, 10). The reduced proportion of QP CD4 TILs could be compatible with lower terminal exhaustion or could imply that terminally exhausted CD4 TILs express different markers. Nonetheless, as in CD8 TILs, sequential CTLA-4 and then TIM-3 expression in CD4 Tconv TILs was concomitant to enhanced expression of PD-1 and TIGIT (Supplemental Figure 2B). Exhausted CD8 TILs express the ectonucleotidase CD39 (8) and its expression is virtually limited to QP CD8 TILs (7). In CD4 TILs, CD39 was likewise expressed in a significant proportion of QP cells (Supplemental Figure 2C). Nonetheless, among TIM-3⁺ CD4 TIL subpopulations, significant proportions of cells expressed CD39 (Supplemental Figure 2C).

We therefore investigated in more depth CD39 expression in CD4 TILs. On average, 37.9% of CD4 Tconv TILs expressed CD39; all CD39⁺ cells expressed high levels of PD-1 (PD-1^{hi}); and CD39 expression was positively correlated to that of PD-1 (Figure 1A). No difference was found in the proportion of CD39⁺ cells among tumor types (Supplemental Figure 2D). Because high PD-1 expression is associated with exhaustion, we analyzed expression of ICs, including CD39, among PD-1^{neg}, PD-1^{int}, and PD-1^{hi} CD4 Tconv TILs (Figure 1B). The PD-1^{hi} population contained the highest proportions of cells expressing the investigated ICs (Figure 1, C and D). Most PD-1^{hi} cells expressed TIGIT, CTLA-4, and CD39, whereas the proportion of TIM-3⁺ cells was lower (Figure 1, C and D). We compared, in CD8 and CD4 Tconv TILs, CD39 and TIM-3 expression among PD-1^{hi} cells. Within the PD-1^{hi} CD4 Tconv fraction, CD39 expression occurred alone or combined with that of TIM-3, whereas cells expressing TIM-3 only were rarely detected (Figure 1E). In contrast, within CD8 PD-1^{hi} cells, CD39 and TIM-3 were systematically coexpressed (Figure 1E). These data show divergence in CD39 and TIM-3 expression between CD4 and CD8 TILs and suggest that exhausted CD4 TILs could be identified by expression of CD39 rather than TIM-3.

To explore the functional consequences of CD39 expression in CD4 Tconv TILs, we stimulated CD4 TILs with PMA and ionomycin and assessed IFN- γ and TNF- α production in Tconv TIL subsets defined according to PD-1 and CD39 expression, i.e., PD-1⁺CD39⁺, PD-1^{lo}CD39⁺, PD-1^{hi}CD39⁺, and PD-1^{hi}CD39⁺ (Figure 2A). The 2 CD4 Tconv PD-1^{hi} populations contained the highest proportions of cytokine⁺ cells, implying advanced differentiation. Assessment of the differentiation stage of CD4 Tconv TILs according to PD-1 expression confirmed this assumption. The PD-1⁺ population contained the highest proportion of central memory (CD45RA⁺CCR7⁺) cells, whereas the PD-1^{hi} population was enriched in effector memory (CD45RA⁺CCR7⁺) cells (Supplemental Figure 3). Within PD-1^{hi} populations, CD39⁺ cells contained high proportions of polyfunctional IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ cells. Their proportions were lower in CD39⁺ cells, in favor of IFN- γ single-positive cells, indicative of terminal exhaustion (Figure 2A) (11). Analysis of IFN- γ ⁺ and TNF⁺ populations showed that their respective MFIs were lower in PD-1^{hi}CD39⁺ cells than in all other populations (Figure 2B), suggesting that these cells produce lower amounts of cytokines. The proportion of cytokine⁺

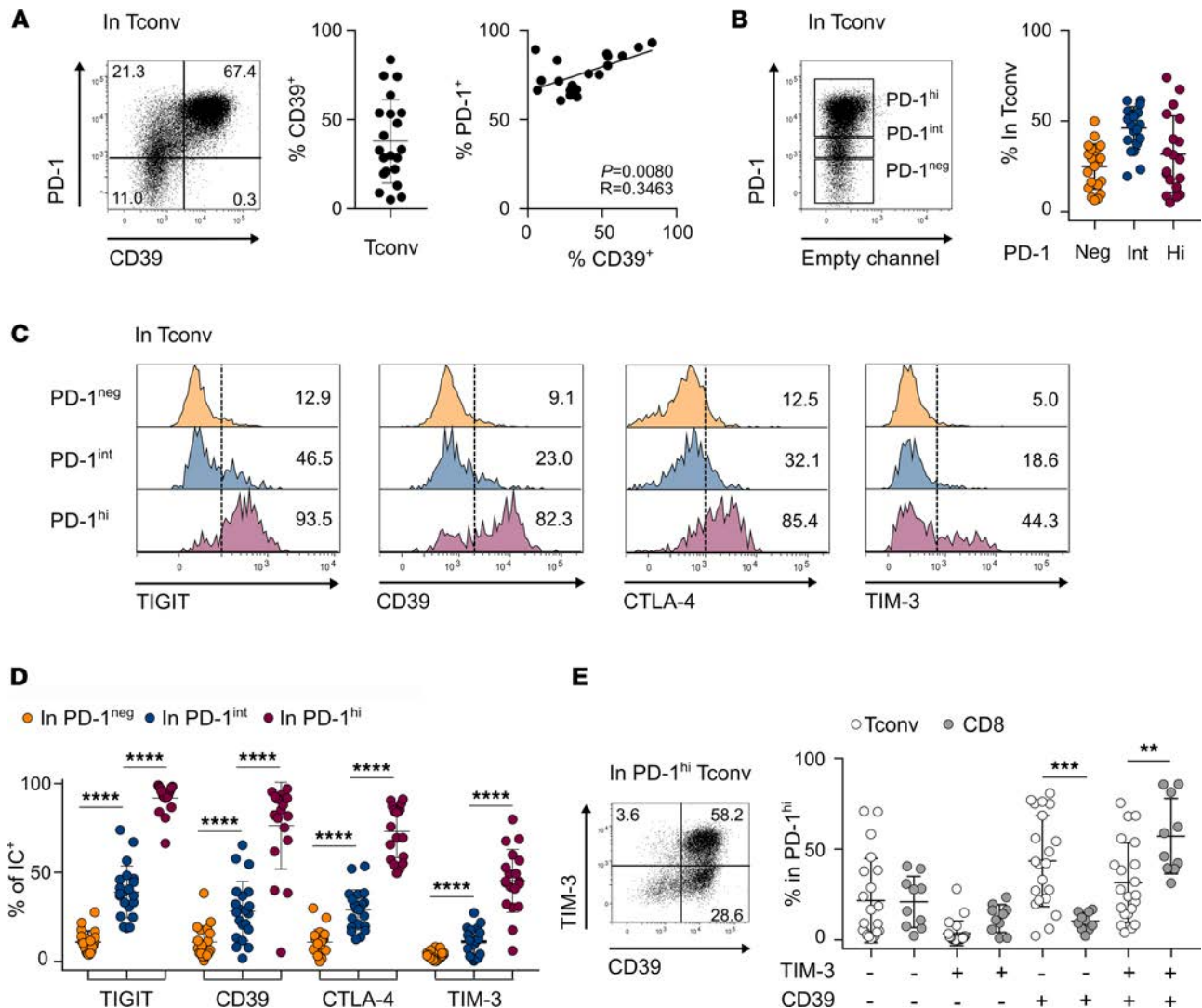


Figure 1. CD39 expression in CD4⁺ Tconv TILs. Isolated CD4⁺ and CD8⁺ TILs were stained ex vivo and analyzed by flow cytometry. **(A)** Dot plot shows PD-1 versus CD39 expression in cells gated on memory CD4 Tconvs as shown in Supplemental Figure 1A. Proportions of CD39⁺ cells (center, $n = 21$) and correlation between the proportion of PD-1⁺ and CD39⁺ (right, $n = 19$) in CD4 Tconvs. **(B)** Dot plot shows PD-1 expression and gates defining PD-1^{neg}, PD-1^{int}, and PD-1^{hi} cells within CD4 Tconvs. Proportions of PD-1^{neg}, PD-1^{int}, and PD-1^{hi} cells in CD4 Tconvs ($n = 21$). **(C and D)** Histogram plots in **C** show TIGIT, CD39, CTLA-4, and TIM-3 expression in PD-1^{neg}, PD-1^{int}, and PD-1^{hi} CD4 Tconvs and proportions are summarized in **D** ($n = 21$). **(E)** Dot plot shows TIM-3 versus CD39 expression in PD-1^{hi} CD4 Tconvs. Proportions of TIM-3⁺CD39⁺, TIM-3⁺CD39⁺, TIM-3⁺CD39⁺, and TIM-3⁺CD39⁺ cells among PD-1^{hi} CD4 Tconvs ($n = 21$) and PD-1^{hi} CD8⁺ TILs ($n = 10$). Data are presented as mean \pm SD. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Pearson's correlation **(A)**, 2-tailed paired t test or Wilcoxon **(D)**, and 2-tailed unpaired t test **(E)** were used to compare variables. Tconvs, conventional FOXP3⁺ CD4 T cells; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

cells and their MFIs did not vary according to TIM-3 expression in PD-1^{hi}CD39⁺ cells (Figure 2, A and B). Ex vivo cell sorting of the 4 CD4 Tconv TIL populations, defined according to PD-1 and CD39 expression, followed by PMA/ionomycin stimulation and secreted cytokine quantification, showed that PD-1^{hi}CD39⁺ cells produced lower amounts of IFN- γ and TNF- α as well as IL-2 (Supplemental Figure 4), features that corroborated their functional exhaustion. In vitro-expanded PD-1^{hi}CD39⁺ cultures produced lower amounts of cytokines after restimulation compared with the other subpopulations (Figure 2C). Collectively, these results put forward CD39, rather than TIM-3, as a marker of terminal exhaustion in CD4 Tconv TILs. In agreement with this assumption, expression of the CD8 T cell exhaustion transcription factor TOX (12, 13) was highest in PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs (Supplemental Figure 5 and Figure 2D).

scRNA-Seq revealed exhaustion, tumor residency, and late differentiation signatures in CD39⁺ CD4 TILs. To further characterize PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs, we performed scRNA-Seq of total CD45⁺ cells isolated ex vivo from 4 head and neck tumors. Of 9872 CD45⁺ cells, 2060 (20.8%) were identified as CD4 Tconvs based on the coexpression of *CD3D*, *CD3E*, and *CD3G*; the detection of barcoded anti-CD4 mAbs; and absence of

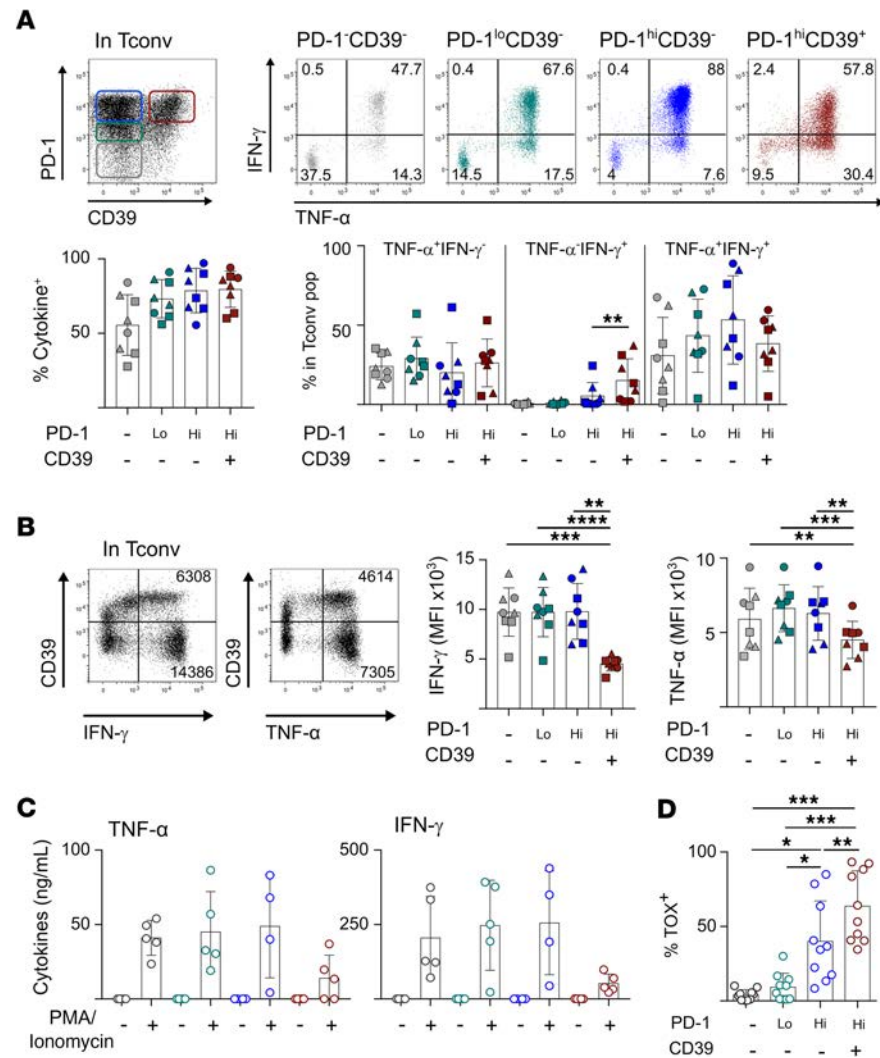


Figure 2. PD-1^{hi}CD39⁺ tumor-infiltrating CD4 Tconvs are functionally exhausted. (A and B) Isolated CD4⁺ TILs were stimulated in vitro with PMA/ionomycin and stained and analyzed by flow cytometry. (A) Top left dot plot shows PD-1 versus CD39 expression in CD4 Tconvs. IFN- γ versus TNF- α expression is shown in the indicated CD4 Tconv populations. Proportions of cytokine⁺ (IFN- γ and/or TNF- α ; bottom left) and TNF- α ⁺IFN- γ ⁻, TNF- α ⁺IFN- γ ⁺, and TNF- α ⁺IFN- γ ⁺ cells in PD-1^{lo}CD39⁻, PD-1^{lo}CD39⁺, PD-1^{hi}CD39⁻, and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets and according to TIM-3 expression ($n = 8$). (B) Dot plots show CD39 versus IFN- γ or TNF- α in CD4 Tconvs. Numbers in dot plots correspond to MFI of cytokine staining. MFI of IFN- γ and TNF- α staining in IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ cells, respectively, are summarized for Tconv subpopulations defined as in A ($n = 8$). Samples in A and B are shown according to the proportion of TIM-3⁺ cells among PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv (<50% TIM-3⁺, square; \geq 50% TIM-3⁺, triangle; unknown, round) (C) CD4 Tconv TIL subsets PD-1^{lo}CD39⁻ (gray), PD-1^{lo}CD39⁺ (green), PD-1^{hi}CD39⁻ (blue), and PD-1^{hi}CD39⁺ (red) were sorted, expanded in vitro for 10 days, and restimulated or not with PMA/ionomycin overnight. TNF- α and IFN- γ secretion was quantified by CBA in the supernatant ($n = 5$). (D) Isolated CD4⁺ TILs were stained ex vivo and analyzed by flow cytometry. Proportions of TOX⁺ cells in each Tconv subset are summarized ($n = 10$). Data are presented as mean \pm SD. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. P values were determined using the Wilcoxon (A and B) and 2-tailed paired t tests (D). Bonferroni's correction was applied to account for multiple testing in D and significance level was adjusted accordingly (* $P < 0.0083$; ** $P < 0.00166$; *** $P < 0.000166$). Tconvs, conventional FOXP3⁺ CD4 T cells; CBA, cytometric bead array; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

FOXP3. Clustering of CD4 T cells identified 15 clusters (Figure 3A). Differential mRNA expression analysis between *ENTPDI* (CD39) positive and negative CD4 Tconv (Figure 3B) identified 291 differentially expressed genes. Among ICs, *CTLA4*, *HAVCR2*, and *LAG3* were upregulated in *ENTPDI*⁺ cells (Figure 3C). *CTLA4* was expressed in the same clusters as *ENTPDI*, whereas *HAVCR2* (TIM-3) was expressed only in a subpopulation of *ENTPDI*⁺ cells (Figure 3C), confirming flow cytometry data. Expression of *LAG3* was detected in the same clusters as *HAVCR2* (Figure 3C). We computed a pseudotime maturation trajectory. Visualizing gene expression levels in cells along the trajectory showed early acquisition of *CTLA4* in comparison with *ENTPDI*,

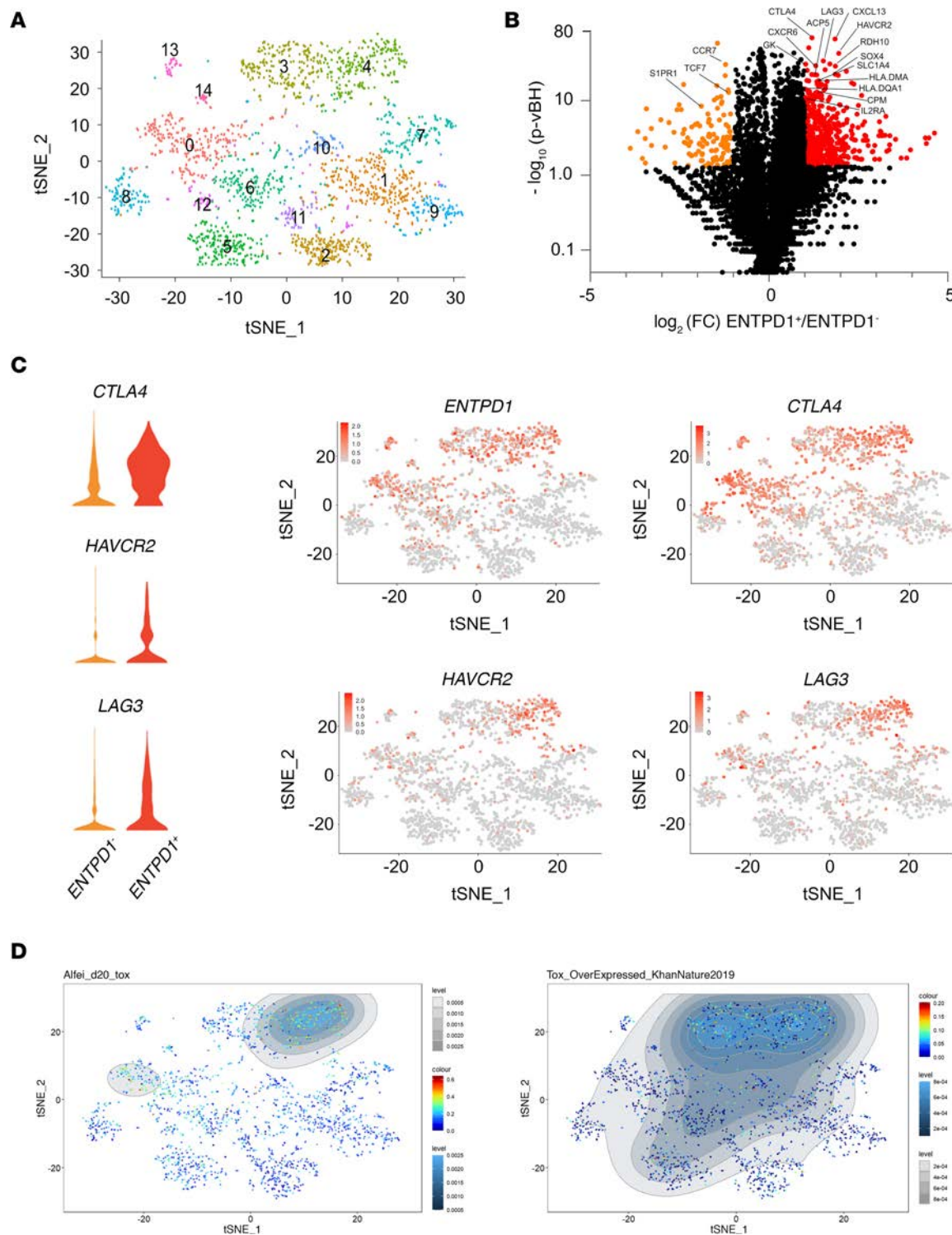


Figure 3. scRNA-Seq of tumor-infiltrating CD4 Tconvs. CD45⁺ cells isolated ex vivo from 4 head and neck cancer specimens were subjected to scRNA-Seq. (A) t-SNE plot of 2060 CD4 Tconvs color-coded by their associated cluster. (B) Results of differential expression analysis of scRNA-Seq data from *ENTPD1*⁺ versus *ENTPD1*⁻ CD4 Tconvs are shown in a volcano plot. Genes significantly upregulated in *ENTPD1*⁺ cells are shown in red and those significantly downregulated are shown in orange. (C) Violin plots showing the expression of *CTLA4*, *HAVCR2*, and *LAG3* in *ENTPD1*⁺ and *ENTPD1*⁻ cells (left) and t-SNE plots color-coded by levels of expression (gray to red) of *ENTPD1*, *CTLA4*, *HAVCR2*, and *LAG3* (right). (D) t-SNE plots showing analysis of TOX exhaustion gene sets (left, ref. 15, and right, ref. 12) using Single-Cell Signature Explorer Viewer. Tconvs, conventional FOXP3⁺ CD4 T cells; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

whereas those of *HAVCR2* and *LAG3* appeared at later stages (Supplemental Figure 6). Differential analysis showed that *ENTPDI*⁺ cells expressed activation markers (*IL2RA* and genes encoding proteins of the MHC class II presentation pathway; Supplemental Figure 7A) and genes encoding proteins involved in metabolic pathways (Supplemental Figure 7B), suggesting that CD39⁺ CD4 TILs are activated. Similar to exhausted CD8 TILs (7), *ENTPDI*⁺ CD4 TILs showed loss of early T cell differentiation markers *CCR7* and *TCF7* (TCF-1) (Supplemental Figure 7C), compatible with their advanced differentiation. Among tissue-resident memory (Trm) cell markers expressed by exhausted CD8 TILs (7), CD4 TILs did not express the adhesion molecules CD103 and CD49a (Supplemental Figure 8, A and B) but expressed CD69 (Supplemental Figure 8C). Differential mRNA analysis revealed that *ENTPDI*⁺ cells exhibited *SIPRI* downmodulation (Supplemental Figure 7D). In addition, *ENTPDI*⁺ cells expressed *CXCR6* (Supplemental Figure 7E), which binds CXCL16 produced in secreted and membrane-bound forms by myeloid cells. Among genes expressed in exhausted CD8 TILs (7, 9), *ENTPDI*⁺ cells expressed *SOX4* and *CXCL13* (Supplemental Figure 7F). Finally, in agreement with TOX expression in PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TILs (Figure 2D), *ENTPDI*⁺ clusters overexpressed TOX transcriptomic signatures (14), identified by Alfei et al. (15) and Khan et al. (12), after transduction of T cells with TOX-encoding retroviruses (Figure 3D). Altogether, these results show that exhausted CD4 TILs, identified by high PD-1 and CD39 expression, share characteristics of the CD8 T cell exhaustion program. Of note, in agreement with previous reports showing no overlap between CD39 or ICs and CD73 expression in human CD4 T cells (16), we detected no expression of *NT5E* (CD73) in Tconv TILs (Supplemental Figure 7G).

PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs encompassed tumor Ag-specific cells and provided help to CD8 T cells upon PD-1 blockade. We investigated Ag specificity of tumor-infiltrating CD4 Tconvs according to PD-1 and CD39 expression. We used the cancer testis Ag NY-ESO-1 as a model (5) and selected a patient with OC who exhibited antibody and CD8 T cell responses to the Ag (7). We sorted ex vivo CD4 Tconv TILs into PD-1^{hi}CD39⁺, PD-1^{hi}CD39⁻, and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets (Figure 2A) and cloned them. In vitro-expanded clonal populations from the PD-1^{hi}CD39⁻ and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets conserved, for the largest part, their ex vivo phenotype (Figure 4, A and B). A proportion of clones derived from sorted PD-1^{hi}CD39⁻ cells gained some level of PD-1 and/or CD39 expression (Figure 4, A and B). We stimulated all clones with a pool of overlapping peptides encompassing full-length NY-ESO-1. Five of twenty-two clones originating from the PD-1^{hi}CD39⁺ subpopulation specifically secreted IFN- γ in response to Ag stimulation, whereas none of the 54 and 17 clones obtained from the PD-1^{hi}CD39⁻ and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets, respectively, showed Ag recognition (Figure 4C). To characterize the fine specificity of NY-ESO-1-specific clones, we stimulated them with the 17 single peptides from the NY-ESO-1 peptide pool. We found that the 5 clones represented 3 different fine specificities (Supplemental Figure 9, A–D) and 3 different MHC restrictions as shown by inhibition of the response after stimulation in the presence of blocking mAbs specific for HLA-DR, HLA-DP, and HLA-DQ (Supplemental Figure 9E). These data demonstrate the stability of the exhausted PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv phenotype and suggest that this subset encompasses tumor Ag-specific CD4 T cells. Ex vivo stimulation of 3 different CD4 TIL samples, from 2 NY-ESO-1 responder patients, with the NY-ESO-1 peptide pool showed that specific CD154 upregulation and IFN- γ production were nearly exclusively detected in the PD-1^{hi}CD39⁺ Tconv subset (Supplemental Figure 10), confirming the PD-1^{hi}CD39⁺ phenotype of tumor Ag-specific CD4 Tconv TILs. Of note, in agreement with their exhausted phenotype, only a minority of specific T cells, identified by CD154 upregulation in response to Ag stimulation, produced IFN- γ (Supplemental Figure 10). We suggest that, similar to CD8 TILs (7–9), CD4 T cell exhaustion at the tumor site is instated in tumor Ag-specific T cells as a result of chronic exposure to the Ag.

We investigated whether blocking anti-PD-1 mAbs could directly affect exhausted CD4 T cell helper activity. We first analyzed the impact of PD-1 blockade on the capacity of CD4 Tconv TILs to help DC maturation. Cytokine secretion by CD4 T cells and DCs increased in CD4/immature DCs (iDCs) cocultures when CD4 TILs were pretreated with anti-PD-1 in comparison with cocultures with nontreated CD4 TILs (Figure 4D). In agreement with these results, we found that PD-1 blockade enhanced CD154 (CD40L) expression in CD4 TILs after stimulation (Figure 4E), implying enhanced ability to induce iDC maturation through CD40-CD40L interaction. Accordingly, anti-PD-1 pretreatment of CD4 TILs led to enhanced DC maturation, as evidenced by increased expression of the costimulatory ligand CD86 (Figure 4F) in addition to enhanced IL-12 secretion (Figure 4D). These results show that CD4 TILs can be targeted by anti-PD-1 mAbs, leading to CD4 TIL activation-mediated DC maturation.

We next asked whether anti-PD-1-mediated CD4 TIL rescue, leading to DC maturation, could affect CD8 T cell proliferation. We selected patients with OC with CD8 T cell responses to NY-ESO-1 identified by HLA/peptide multimer staining (7). We preincubated or not CD4 TILs from these patients with

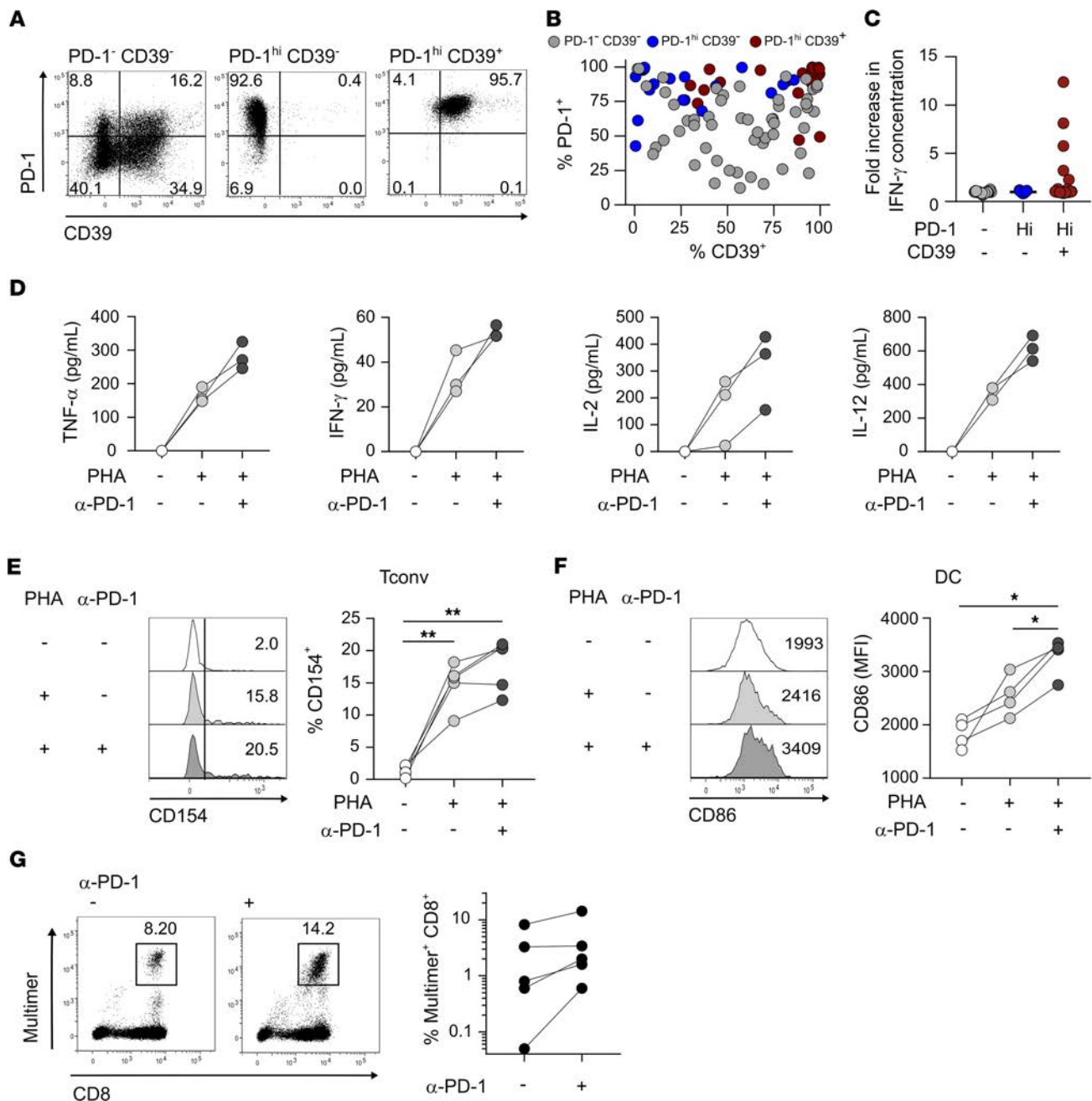


Figure 4. PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs encompass tumor Ag-specific cells and respond to PD-1 blockade by enhancing DC-mediated CD8 T cell proliferation. (A–C) Ex vivo isolated CD4⁺ TILs from one OC NY-ESO-1-seropositive patient were FACS-sorted into PD-1^{lo}CD39^{lo}, PD-1^{hi}CD39^{lo}, and PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺) subsets and cloned. (A and B) Clonal populations were stained and analyzed by flow cytometry. (A) PD-1 versus CD39 expression in clones representative of the 3 sorted Tconv populations. (B) Proportions of PD-1⁺ and CD39⁺ cells are summarized for all clones derived from PD-1^{lo}CD39^{lo} ($n = 54$), PD-1^{hi}CD39^{lo} ($n = 17$), and PD-1^{hi}CD39⁺ ($n = 22$) subsets. (C) IFN- γ concentration in the supernatant was quantified by ELISA for each clone stimulated with NY-ESO-1 peptide pool (fold increase over unstimulated condition) (n as in B). (D–F) Ex vivo CD4⁺ TILs (\pm anti-PD-1 mAbs pretreatment) were cocultured with iDCs in the presence or absence of PHA. (D) TNF- α , IFN- γ , IL-2, and IL-12 concentrations were quantified by CBA in the 24-hour supernatants ($n = 3$). (E) Histogram plots show CD154 expression in CD4 Tconvs after 6-hours stimulation. Proportions of CD154⁺ cells are summarized ($n = 5$). (F) Histogram plots show CD86 expression in DCs in day 2 cultures. MFI of CD86 staining are summarized ($n = 4$). (G) CD4⁺ TILs from OC NY-ESO-1-seropositive patients (\pm anti-PD-1 mAbs pretreatment); autologous iDCs and circulating CD8 T cells were cocultured in the presence of NY-ESO-1 peptides, stained with MHC-I/NY-ESO-1 peptide multimers on day 10, and analyzed by flow cytometry. Examples of dot plots show multimer staining and CD8 expression and proportions of multimer⁺CD8⁺ cells are summarized ($n = 5$). A 2-tailed paired t test was used to compare variables (E and F). Bonferroni's correction was applied to account for multiple testing (E and F) and significance level was adjusted accordingly ($*P < 0.016$; $**P < 0.0032$). (E and F). Tconvs, conventional FOXP3⁺ CD4 T cells; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes; OC, ovarian cancer; iDCs, immature DCs; CBA, cytometric bead array.

anti-PD-1 mAbs and cocultured them with autologous iDCs and circulating CD8 T cells in the presence of NY-ESO-1 peptides (Supplemental Figure 11). Proliferation of NY-ESO-1-specific CD8 T cells in response to the Ag increased in the presence of anti-PD-1 pretreated CD4 TILs in comparison with nontreated CD4 TILs (Figure 4G). We previously found that PD-1⁺ circulating tumor-specific CD8 T cells proliferate after Ag stimulation and PD-1 inhibition (7). Data presented here show that PD-1 blockade could in addition indirectly contribute to tumor-specific CD8 T cell proliferation through in situ reactivation of tumor Ag-specific PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs and DC maturation.

Discussion

Our results set forth exhausted CD4 T cells at the tumor site as players of response to PD-1 blockade. We identified high expression of PD-1 associated with CD39 expression as markers of CD4 T cell exhaustion in situ in 3 epithelial malignancies. PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TILs shared characteristics of CD8 T cell exhaustion, in particular, expression of the exhaustion transcription factor TOX (7, 13) and its target genes (12, 15) as well as specificity for tumor Ags (7–9). We showed that although the PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TIL population contained high proportions of cytokine-producing cells, the amount of cytokines produced by these cells was lower than that produced by cytokine⁺ cells within the other CD4 TIL subpopulations, supporting their exhausted state. PD-1 blockade in CD4 TILs increased the amount of cytokines produced as well as CD154 upregulation after stimulation, leading to enhanced DC maturation. In a tumor Ag-specific model, we showed that PD-1 blockade in specific PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TILs supported proliferation of autologous CD8 T cells specific for the same Ag, implying that CD4 TILs exert helper functions in situ, which could be enhanced by PD-1 blockade. Based on the results presented here and our previous work (7), we propose a model whereby circulating PD-1⁺ tumor-specific CD8 T cells reach the tumor site where they are stimulated by DCs, proliferate, acquire Trm markers to be retained locally, and become terminally exhausted. Under anti-PD-1/PD-L1, CD8 proliferation could be enhanced through direct blockade of PD-1 on CD8 T cells and through reinvigoration of the helper activity of tumor Ag-specific CD4 T cells.

CD8 T cell exhaustion is instated as a means of adapting the immune response to chronic infection and cancer (17, 18). It has been proposed that degrees of exhaustion are linked to disease severity (18). In line with this concept, we showed that ICs are sequentially acquired by tumor-specific CD8 T cells at the tumor site, leading to a terminally exhausted population characterized by TIM-3 expression, the latter being acquired at late stages after PD-1, TIGIT, and CTLA-4 expression acquisition (7). Other studies also found that TIM-3⁺ CD8 TILs are terminally exhausted and encompass tumor-specific cells (8–10). This exhaustion stage was attained by Ag-specific CD8 TILs but not by bystander T cells specific for, for instance, viral Ags (7), suggesting that chronic stimulation in the tumor milieu could be responsible for its instatement. Contrary to CD8 TILs, where CD39 and TIM-3 are virtually always coexpressed, the exhausted PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TIL population harbored both TIM-3[−] and TIM-3⁺ cells. This could reflect a lesser degree of chronic stimulation at the tumor site, compatible with the fact that CD4 TILs recognize Ag-presenting cells (APCs) but not tumor cells that are, for most tumor types, devoid of MHC class II molecules, in contrast to CD8 TILs that are stimulated by both APC and tumors (4). Expression of activation markers and proteins involved in metabolic pathways together with the absence of early memory markers were nonetheless in agreement with the chronic stimulation of exhausted CD4 TILs at the tumor site. Accordingly, PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TILs exhibited several features found in exhausted CD8 T cells, including expression of TOX and its target genes (12, 13, 15) as well as that of SOX-4 and CXCL13. SOX-4-mediated CXCL13 production by CD4 T cells is involved in the formation of ectopic lymphoid-like structures (TLSs) in rheumatoid arthritis (19). CXCL13 expression by exhausted CD8 TILs is associated with B cell recruitment and TLS formation (20). Our results imply that exhausted CD4 TILs could also contribute to B cell recruitment and TLS formation within the tumor microenvironment. We and others found that exhausted CD8 TILs express the Trm markers CD103, CD69, and CD49a (7, 8, 21). Of those, exhausted CD4 TILs expressed CD69 only but expressed CXCR6 and exhibited S1PR1 downmodulation. CXCR6 expression could imply enhanced interaction of CD4 TILs with APC, which produce the secreted and membrane-bound forms of the CXCR6 ligand CXCL16, and could be indicative, with CD69 expression and S1PR1 downregulation, of their tissue residency (7, 22, 23). Expression of activation markers, indicative of in situ stimulation and proliferation, and tissue residency are compatible with the accumulation of tumor Ag-specific CD4 T cells at the tumor site where they are found at higher frequencies than in the periphery (5) and could imply that, like exhausted CD8 TILs, exhausted CD4 TILs encompass Ag-specific T cells. Our data show that T cells specific for the cancer testis Ag NY-ESO-1 are solely found within the PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 TIL population. In a distinct tumor Ag model, CD39⁺ CD4 and CD8 TILs were found to be specific for HPV Ags in HPV-induced malignancies (24).

The presence of exhausted CD8 T cells within tumors, being indicative of an ongoing antitumor immune response, is correlated to clinical responsiveness to ICB (7, 10, 25). Clinical responses are correlated to both exhausted tumor Ag-specific CD8 T cell proliferation (7, 26, 27) in the periphery and at the tumor site and in situ reversal of exhaustion (7). Accumulation of tumor Ag-specific CD4 T cells at tumor sites indicates that they play effector functions through, for instance, IFN- γ secretion (4). Alspach and colleagues showed that the presence of tumor Ag-specific cells, specifically among CD4 TILs, was necessary for tumor regression after immunotherapy by PD-1/PD-L1 axis blockade in a mouse model (6), suggesting that PD-1 blockade directly targets PD-1⁺ CD4 TILs. Our results show that PD-1 blockade, specifically on CD4 TILs, increased their helper functions as evidenced by enhanced DC maturation, leading to increased CD86 expression and IL-12 secretion. In the NY-ESO-1 model, we showed that PD-1 blockade on CD4 TILs led to enhanced proliferation of autologous NY-ESO-1-specific CD8 T cells supporting a major role for CD4 help in CD8 T cell proliferation in situ. This is in agreement with the requirement for a DC and CD8 T cell crosstalk and IL-12 and IFN- γ secretion for responsiveness to immunotherapy (28). Results obtained in the NY-ESO-1 model, whereby specific CD4 T cells are PD-1^{hi}CD39⁺, show that anti-PD-1 can restore helper functions of this terminally exhausted population.

The ectonucleotidase activity of CD39 cleaves extracellular ATP and ADP into AMP that is in turn converted into adenosine by the ectonucleotidase CD73. Because ATP is able to enhance DC maturation through purinergic/pyrimidinergic receptors (29), its consumption by CD39 on exhausted CD4 T cells could contribute to, in addition to their exhaustion, their reduced helper activity towards DC. It would be of interest to assess this hypothesis using blocking anti-CD39 mAbs. However, because CD39 is also expressed by DCs, it would be complex in a coculture system, like the one we used here, to assess the specific contribution of CD4 T cells to modulation of ATP concentrations. Adenosine has an immunosuppressive activity and can have direct effects on T cells, leading to reduced proliferation (29). We showed that CD39⁺ CD4 TILs did not express CD73, which was in agreement with previous reports showing no coexpression of CD39 and CD73 in CD4 TILs (16). Therefore, CD39 could not be directly involved in CD4 TIL exhaustion in a cell-intrinsic manner. However, CD39 expression by exhausted CD4 TILs could contribute to adenosine production in the context of the tumor microenvironment, where CD73 is expressed both by immune and tumor cells (29).

Methods

Patient and healthy donor samples. Peripheral blood and tumor samples were collected from 63 patients with head and neck, ovarian, and cervical cancer at the time of surgery for primary disease or for recurrence. The patients included in this study were as follows: 14 patients with stage FIGO IB1-IIIB HPV 16 and/or 18 positive cervical cancer with squamous and adenocarcinoma histology (primary disease, 13 patients; recurrence, 1 patient); 25 patients with stage FIGO IIIB-IVA OC (primary disease, 22 patients; recurrence, 3 patients; high-grade serous carcinoma, 22 patients; clear cell carcinoma, 1 patient; carcinosarcoma, 2 patients); and 24 patients with newly diagnosed (22 patients) or locoregional recurrent (2 patients) head and neck cancer. All patients had histologically documented tumors, were 18 years old or older at the time of study entry, were followed within a standard of care procedure, and had an ECOG performance status of 0–2. Exclusion criteria were as follows: known history of positive test for hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency, or hantaviruses; any condition contraindicated with blood sampling procedures; pregnancy or breastfeeding; and active suspected or prior documented autoimmune disease or use of immunosuppressive medication. Patients did not receive any therapy during the 3 months prior to study entry. Blood samples from healthy donors (HDs) were obtained from the Etablissement Français du Sang (Toulouse, France).

PBMCs from patients or HDs were isolated by density gradient sedimentation using Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Tumor samples were rapidly transported to the research facility on ice. On arrival, samples were rinsed with PBS (Sigma-Aldrich), subsequently minced on ice to smaller pieces, between 2 mm and 4 mm, dissociated using C-tubes (Miltenyi Biotec) and gentleMACS Octo Dissociator (Program MultiC01_01; Miltenyi Biotec) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma-Aldrich), and filtered using a 40 μ m nylon mesh (BD Biosciences). PBMCs and tumor single-cell suspensions were cryopreserved in FBS (Gibco) containing 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

For scRNA-Seq experiments, 4 head and neck tumors were minced as detailed above, transferred into digestion medium (Tumor Dissociation Kit, human, Miltenyi Biotec), and dissociated using C-tubes and gentleMACS Octo Dissociator (Program h_TDK3, 37°C). Samples were filtered using a 40 μ m nylon mesh. Cell suspensions were then centrifuged at 300g and 4°C for 7 minutes. The supernatant was discarded and cell pellets were resuspended in 1 mL Red Blood Cell Lysis Buffer (Miltenyi Biotec), incubated for 10 minutes

at 4°C, centrifuged, and pellets were resuspended in PBS containing 0.04% BSA (EUROMEDEX). CD45⁺ cells were enriched by positive magnetic selection from single-cell suspensions (CD45 MicroBeads, human, OctoMACS Separator, MS Columns, Miltenyi Biotec). Finally, cells were counted to determine the proportion of live cells. Only samples containing greater than 90% live cells were used for scRNA-Seq experiments.

Cell purification and phenotypic assessment. CD4⁺ and CD8⁺ cells were enriched from tumor single-cell suspensions by magnetic positive selection (CD4 or CD8 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec) using OctoMACS Separator and MS Columns. Cells were assessed phenotypically by staining with fluorochrome-labeled mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD45RA, PD-1, TIGIT, TIM-3, CD103, CD49a, CD69, and CD39, as indicated. For intracellular and intranuclear staining, cells were fixed, permeabilized, and stained with mAbs specific for CTLA-4, FOXP3, and TOX using the Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). mAbs used for flow cytometry analysis are listed in Supplemental Table 1. Cells were analyzed using a BD LSRFortessa X20 flow cytometer and data were analyzed using DIVA software (BD Biosciences) or Flowlogic software (Miltenyi Biotec).

T cell functional assessment. CD4⁺ T cells isolated from tumor single-cell suspensions by magnetic positive selection were stimulated with PMA (100 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 g/mL; Sigma-Aldrich) for 6 hours in IMDM supplemented with 1% Penicillin–Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Invitrogen), L-glutamine (2 mM, Invitrogen), and 10% human serum (Institut de Biotechnologies Jacques Boy). Brefeldin-A (BFA; 10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added 1 hour after the beginning of the incubation. Cells were then stained, as described above, with mAbs specific for CD3, CD4, CD39, PD-1, and FOXP3, and cytokine production was assessed by intracellular staining using IFN-γ-specific and TNF-α-specific mAbs (Supplemental Table 1). Cells were analyzed by flow cytometry (BD LSRFortessa X20).

For detection of cytokine secretion, isolated CD4⁺ TILs were stained with mAbs specific for CD3, CD4, CD8, PD-1, CD39, CD127, and CD25, and CD4 Tconvs (CD3⁺CD8⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺) were sorted into PD-1[−]CD39[−], PD-1^{lo}CD39[−], PD-1^{hi}CD39[−], and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets by flow cytometry cell sorting (BD FACSAria Fusion). Sorted cells were stimulated with PMA/ionomycin overnight. mAbs used for cell sorting are listed in Supplemental Table 2. TNF-α, IFN-γ, and IL-2 were quantified in the supernatant by cytometric bead array (CBA; BD Biosciences).

For cytokine detection after cell expansion, the PD-1[−]CD39[−], PD-1^{lo}CD39[−], PD-1^{hi}CD39[−], and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets were sorted as described above and stimulated in vitro with irradiated (35 Gy) PBMCs, phytohemagglutinin (PHA; 1 µg/mL; Sigma-Aldrich) and recombinant human (rh) IL-2 (150 IU/mL; Miltenyi Biotec). Day 20 cultures were stimulated or not with PMA/ionomycin overnight and TNF-α and IFN-γ were quantified in the supernatant by ELISA (Invitrogen).

To characterize ex vivo NY-ESO-1-specific CD4 Tconv TILs, magnetically sorted CD4⁺ TILs were cocultured with magnetically sorted autologous circulating CD14⁺ cells (CD14 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec) in the presence or absence of a pool of 17 overlapping 20 to 24 amino acid-long peptides encompassing full-length NY-ESO-1 (1 µM of each peptide in the pool; Peptide 2.0 Inc.; Supplemental Table 3) for 6 hours. BFA (3 µg/mL; eBioscience) was added 1 hour after the beginning of stimulation. After surface staining with mAbs specific for CD3, CD4, PD-1, CD39, and FOXP3, intracellular staining was performed using mAbs specific for IFN-γ and CD154 and cells were analyzed by flow cytometry.

Droplet-based scRNA-Seq and single-cell gene expression analysis. CD45⁺ cells (200,000–400,000 cells), prepared as detailed above, were stained with barcoded TotalSeq-A mAbs (Biolegend). Single-cell libraries (3' gene expression and antibody-derived tag fractions) were generated using the Chromium Controller Instrument and Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v3 according to the manufacturer's protocol (10× Genomics), with some modifications as previously described (30). To detect barcoded TotalSeq-A antibodies, an ADT library was constructed as previously described for CITE-Seq (30). Single-cell library size and quality were confirmed on the Fragment Analyzer (Agilent). KAPA Quantification Kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Roche) was used to quantify libraries. Samples were pooled in equimolar fashion with desired proportions for the 2 library types (cDNA library fraction at 90% and ADT library at 10%). The libraries were sequenced on a NextSeq 550 (Illumina) in pair-end sequencing 28 bp (read1) × 91 bp (read2) and a single index 8 bp in length. Raw data (FastQ files) for expression and antibody detection were computed with CellRanger 3.0 and the GRCh38 transcriptome as reference (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/using/count>). Data were then loaded in an R session with the Seurat 3.0 toolkit package involving the normalization and variance stabilization package SCTransform (31). Samples

were individually filtered using unique molecular identifier (<30,000) and percentage of mitochondrial genes (<0.25%) criteria. Using Seurat, data sets were reduced by PCA, using the first 11 principal components to reduce dimensionality by t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE). A resolution parameter set the granularity at 1.2 for the clustering by the K-nearest neighbor graph-based clustering approach of Seurat's FindClusters function. Tconvs were selected with Single-Cell Virtual Cytometer software (32) using the sum of *CD3D*, *CD3E*, and *CD3G* gene expression, CD4-barcoded TotalSeq-A mAbs signal, and absence of *FOXP3* gene expression. Wilcoxon's *P* values for differentially expressed genes were adjusted with Benjamini-Hochberg at *p*-vBH greater than 3 and illustrated in a volcano plot. The maturation trajectories of the selected T cells were computed with the Dynverse package (33) using Slingshot tool (34). Trajectories were represented as dendrograms. Expression of genes from the TOX signatures published by Alfei et al. (15) and Khan et al. (12) were analyzed using Single-Cell Signature Explorer Viewer (14).

scRNA-Seq data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO series accession number GSE148162.

CD4 Tconv TILs cell sorting and cloning and phenotypic and functional characterization of clonal populations. CD4⁺ cells were magnetically sorted ex vivo from tumor single-cell suspensions, as described above, from 1 patient with OC, who we previously identified as a responder to NY-ESO-1 with detectable CD8 T cell and antibody responses (7). Isolated CD4⁺ T cells were stained with CD3, CD4, CD8, PD-1, CD39, CD127, and CD25 mAbs, and CD4 Tconvs (CD3⁺CD8⁻CD4⁺CD25⁻CD127⁺) were FACS-sorted into PD-1⁻CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻, and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets (BD FACSaria Fusion). mAbs are listed in Supplemental Table 2. Sorted cells were cloned by limiting dilution in presence of allogeneic irradiated (35 Gy) PBMCs, PHA (1 µg/mL), and rhIL-2 (150 IU/mL). Clones were subsequently expanded by periodic stimulation (every 2 to 3 weeks) under similar conditions. Phenotyping of clones obtained from each subset was performed on day 12 after restimulation cultures using mAbs specific for CD3, CD4, PD-1, and CD39 and flow cytometry analysis.

To identify NY-ESO-1-specific clones, all clones from the PD-1⁻CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻, and PD-1^{hi}CD39⁺ subsets were incubated overnight in IMDM supplemented with 10% HS in the presence or absence of the NY-ESO-1 long peptide pool (1 µM) and IFN-γ concentration was assessed in the culture supernatant by ELISA.

For functional assessment of clones by intracellular cytokine and CD154 staining, monocyte-derived iDCs from HLA-matched HDs were used in some experiments. To identify HLA-matched HDs able to present NY-ESO-1 peptides to specific clones, total PBMCs from HDs were incubated overnight at 37°C in the presence or absence of the NY-ESO-1 long peptide pool (1 µM). After thorough washing, clones were added to PBMCs in IMDM 10% HS medium containing BFA (3 µg/mL). After a 3-hour incubation, cells were stained with mAbs specific for CD3, CD4, IFN-γ, and TNF-α and analyzed by flow cytometry. To derive iDCs, CD14⁺ cells were enriched from PBMCs by magnetic positive selection and cultured for 5 days in IMDM 10% HS supplemented with rhIL-4 and GM-CSF, both at 1000 IU/mL (Miltenyi Biotec).

To determine the fine specificity of NY-ESO-1-specific clones, they were stimulated independently with each of the NY-ESO-1 long peptides (1 µM) for 4 hours at 37°C in the presence of HLA-matched iDCs from HDs. BFA (3 µg/mL) was added 1 hour after the beginning of the incubation. After surface staining with mAbs specific for CD3 and CD4, intracellular staining was performed using mAbs specific for IFN-γ, TNF-α, and CD154 and cells were analyzed by flow cytometry.

For inhibition experiments with blocking anti-HLA class II mAbs, iDCs from HLA-matched HDs were preincubated for 1 hour at 37°C with anti-HLA-DR, anti-HLA-DP, or anti-HLA-DQ mAbs (10 µg/mL; Supplemental Table 4), then clones and NY-ESO-1 peptides were added and cultures were supplemented with BFA (3 µg/mL) 1 hour after beginning of stimulation. After 4 hours incubation, IFN-γ and TNF-α production was assessed by intracellular staining and flow cytometry analysis as described above.

Functional characterization of CD4 TILs after PD-1 blockade. iDCs were obtained from HD as described above. Isolated CD4⁺ TILs were preincubated or not with anti-PD-1 mAbs (10 µg/mL; Bristol-Myers Squibb) for 30 minutes at 4°C and washed twice with IMDM supplemented with 10% FBS. iDCs (75,000 to 100,000 cells, per well) and anti-PD-1 pretreated or not CD4⁺ TILs (50,000 to 100,000 cells, per well) were cocultured in the presence or absence of PHA (1 µg/mL) in IMDM 10% HS. For the assessment of CD40L expression in CD4 cells, BFA (3 µg/mL) was added 1 hour after the beginning of the incubation, and intracellular staining was performed at 6 hours with mAbs specific for CD154 after surface CD3 and CD4 staining. To assess cytokine secretion and DC maturation, supernatants were harvested at 24 hours and cytokine concentration was measured by CBA. Cells were harvested at 48 hours using Trypsin-EDTA (Gibco) and stained with mAbs specific for CD86. Cells were analyzed by flow cytometry and CD86 MFI was assessed on gated DCs based on FSC and SSC criteria.

To assess the effect of CD4 T cell PD-1 blockade on CD8⁺ T cells, CD8⁺ cells were magnetically sorted from PBMCs from patients with OC, who we previously identified as responders to NY-ESO-1 with detectable CD8 T cell and antibody responses (7). Isolated CD8⁺ T cells (0.5×10^6 to 1×10^6 cells, per well) were cocultured with autologous iDCs (200,000 to 400,000 cells, per well), obtained from CD14⁺ cells as detailed above, and autologous CD4⁺ TILs (200,000 cells, per well) were pretreated or not with anti-PD-1 mAbs (10 g/mL), as described above, and rhIL2 (20 IU/mL) and stimulated with NY-ESO-1 peptides. Short NY-ESO-1 peptides (1 μ M for HLA-A0201-restricted peptide and 0.5 μ M for HLA-Cw0304-restricted and HLA-B3501-restricted peptides; Peptide 2.0 Inc.; Supplemental Table 5), selected according to patient HLA, were used to stimulate specific CD8 T cells and the NY-ESO-1 long peptide pool (1 μ M) was used to stimulate specific CD4 Tconv TILs. Day 10 cultures were stained with HLA class I dextramers containing NY-ESO-1 peptides (Immudex) for 30 minutes at room temperature prior to anti-CD8 mAbs staining and analyzed by flow cytometry. HLA class I/peptide multimers are listed in Supplemental Table 6.

Statistics. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. For normally distributed values, the 2-tailed *t* test was used in case of paired or unpaired data. When the values were not normally distributed, the comparison of variables was performed with Wilcoxon or Mann-Whitney *U* test for paired and unpaired data, respectively. For each test, a *P* value of less than 0.05 was considered significant. Analyses were performed with GraphPad Prism 7 software.

Study approval. Peripheral blood and tumor samples were collected from patients with head and neck, ovarian, and cervical cancer at the time of surgery at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole in accordance to the Declaration of Helsinki, upon approval by the Institutional Review Board (DC-2016-2656 and DECIDE protocol, NCT03958240) and signed informed consent.

Author contributions

CCB designed research, conducted experiments, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript. AS, CMS, and MM designed research, conducted experiments, acquired and analyzed the data, and participated in drafting the manuscript. CMG, CGR, VS, GF, LG, SV, ADB, EM, PR, JPD, and AM provided patient samples and analyzed clinical data. MT, FP, and JJF developed software and analyzed scRNA-Seq data. VS, CMG, and CV conducted experiments and acquired and analyzed data. CD and AM supervised research. MA designed and supervised research, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Acknowledgments

The study was supported by MSDAVENIR and the Cancer Research Institute. We are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrénées for providing computing resources. This work was granted access to the HPC resources of CALMIP supercomputing center under the allocation P19043.

Address correspondence to: Maha Ayyoub, Cancer Research Center of Toulouse, INSERM UMR 1037, 2 avenue Hubert Curien, CS 53717, 31037 Toulouse, France. Phone: 33 582 74 16 87; Email: maha.ayyoub@inserm.fr.

1. Ayyoub M, et al. An immunodominant SSX-2-derived epitope recognized by CD4⁺ T cells in association with HLA-DR. *J Clin Invest.* 2004;113(8):1225–1233.
2. Hamai A, et al. Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN- γ -secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res.* 2012;72(5):1059–1063.
3. Borst J, et al. CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(10):635–647.
4. Kim H-J, Cantor H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(2):91–98.
5. Ayyoub M, et al. CD4⁺ T effectors specific for the tumor antigen NY-ESO-1 are highly enriched at ovarian cancer sites and coexist with, but are distinct from, tumor-associated Treg. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(5):303–308.
6. Alspach E, et al. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. *Nature.* 2019;574(7780):696–701.
7. Balança C-C, et al. Dual relief of T-lymphocyte proliferation and effector function underlies response to PD-1 blockade in epithelial malignancies. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(7):869–882.
8. Duhon T, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun.* 2018;9(1):2724.
9. Thommen DS, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1⁺ CD8⁺ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med.* 2018;24(7):994–1004.
10. Sade-Feldman M, et al. Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma. *Cell.* 2018;175(4):998–1013.
11. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492–499.
12. Khan O, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature.* 2019;571(7764):211–218.

13. Scott AC, et al. TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature*. 2019;571(7764):270–274.
14. Pont F, et al. Single-Cell Signature Explorer for comprehensive visualization of single cell signatures across scRNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(21):e133.
15. Alfei F, et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*. 2019;571(7764):265–269.
16. Gourdin N, et al. Autocrine adenosine regulates tumor polyfunctional CD73⁺CD4⁺ effector T cells devoid of immune checkpoints. *Cancer Res*. 2018;78(13):3604–3618.
17. McLane LM, et al. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:457–495.
18. Bengsch B, et al. Epigenomic-guided mass cytometry profiling reveals disease-specific features of exhausted CD8 T cells. *Immunity*. 2018;48(5):1029–1045.
19. Yoshitomi H, et al. Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments. *Nat Commun*. 2018;9(1):3762.
20. Workel HH, et al. A transcriptionally distinct CXCL13⁺CD103⁺CD8⁺ T-cell population is associated with B-cell recruitment and neoantigen load in human cancer. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(5):784–796.
21. Djenidi F, et al. CD8⁺CD103⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol*. 2015;194(7):3475–3486.
22. Skon CN, et al. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1285–1293.
23. Pallett LJ, et al. IL-2^{hi} tissue-resident T cells in the human liver: sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med*. 2017;214(6):1567–1580.
24. Kortekaas KE, et al. CD39 identifies the CD4⁺ tumor-specific T-cell population in human cancer. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(10):1311–1321.
25. Miller BC, et al. Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. 2019;20(3):326–336.
26. Siddiqui I, et al. Intratumoral Tcf1⁺PD-1⁺CD8⁺ T Cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy. *Immunity*. 2019;50(1):195–211.
27. Kamphorst AO, et al. Proliferation of PD-1⁺ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(19):4993–4998.
28. Garri CS, et al. Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*. 2018;49(6):1148–1161.
29. Perrot I, et al. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies. *Cell Rep*. 2019;27(8):2411–2425.
30. Stoeckius M, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods*. 2017;14(9):865–868.
31. Stuart T, et al. Comprehensive integration of single-cell data. *Cell*. 2019;177(7):1888–1902.
32. Pont F, et al. Single-cell virtual cytometer allows user-friendly and versatile analysis and visualization of multimodal single cell RNAseq datasets. *NAR Genomics and Bioinformatics*. 2020;2(2).
33. Saelens W, et al. A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat Biotechnol*. 2019;37(5):547–554.
34. Street K, et al. Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics*. 2018;19(1):477.

Supplemental Data Materials

Supplemental Tables 1-6

Supplemental Figures 1-11

Supplemental Tables

Supplemental Table 1: List of flow cytometry antibodies

Antibody	Clone	Catalog number	Manufacturer	RRID
CD3	UCH-T1	555333	BD	AB_395740
CD3	UCH-T1	555332	BD	AB_395739
CD3	UCH-T1	563546	BD	AB_2744387
CD3	UCH-T1	563109	BD	AB_2732053
CD3	UCH-T1	555335	BD	AB_398591
CD4	RPA-T4	560768	BD	AB_1937323
CD4	RPA-T4	564724	BD	AB_2738917
CD8	RPA-T8	560774	BD	AB_1937325
CD39	TU66	563681	BD	AB_2738370
CD45RA	HI100	11-0458-42	eBioscience	AB_11219672
CD49a	SR84	559596	BD	AB_397288
CD69	FN50	560737	BD	AB_1727508
CD86	2331 (FUN1)	555658	BD	AB_396013
CD103	BER-ACT8	550259	BD	AB_393563
CD152 (CTLA-4)	BNI3	563931	BD	AB_2738491
CD154	TRAP1	555700	BD	AB_396050
PD-1	EH12.1	565299	BD	AB_2739167
TIGIT	MBSA43	25-9500-42	eBioscience	AB_2573548
CD366 (TIM-3)	7D3	565562	BD	AB_2744369
TOX	TXRX10	50-6502-82	eBioscience	AB_2574265
IFN- γ	B27	557995	BD	AB_396977
TNF- α	MAb1	557647	BD	AB_396764
FOXP3	PC5101	56-4776-41	eBioscience	AB_1582210
FOXP3	PCH101	11-4776-42	eBioscience	AB_1724125

Supplemental Table 2: List of antibodies for FACS cell sorting

Antibody	Clone	Catalog number	Manufacturer	RRID
CD3	UCH-T1	561027	BD	AB_10561682
CD4	RPA-T4	555346	BD	AB_395751
CD8	RPA-T8	560774	BD	AB_1937325
CD39	TU66	563681	BD	AB_2738370
PD-1	EH12.1	563789	BD	AB_2738425
CD127	HIL-7R-M21	560551	BD	AB_1645548
CD25	B1.49.9	B09684	Beckman Coulter	AB_2861133

Supplemental Table 3: List of NY-ESO-1 long peptides for CD4 T-cell stimulation

Peptide	Sequence
NY-ESO-1₁₋₂₀	MQAEGRGTTGGSTGDADGPGG
NY-ESO-1₁₁₋₃₀	STGDADGPGGGPDPGPGGN
NY-ESO-1₂₁₋₄₀	PGIPDGPGGNAGGPGEAGAT
NY-ESO-1₃₁₋₅₀	AGGPGEAGATGGRGPRGAGA
NY-ESO-1₄₁₋₆₀	GGRGPRGAGAARASGPGGGA
NY-ESO-1₅₁₋₇₀	ARASGPGGGAPRGPHGGAAS
NY-ESO-1₆₁₋₈₀	PRGPHGGAASGLNGCCRCGA
NY-ESO-1₇₁₋₉₀	GLNGCCRCGARGPESRLLEF
NY-ESO-1₈₁₋₁₀₀	RGPEPRLLEFYLAMPFATPM
NY-ESO-1₉₁₋₁₁₀	YLAMPFATPMELARRSLA
NY-ESO-1₁₀₁₋₁₂₀	EELARRSLAQDAPPLPVP
NY-ESO-1₁₁₁₋₁₃₀	QDAPPLPVPVLLKEFTVSG
NY-ESO-1₁₁₉₋₁₄₃	PGVLLKEFTVSGNLTIRLTADHR
NY-ESO-1₁₃₁₋₁₅₀	NLTIRLTADHRQLQLSIS
NY-ESO-1₁₃₉₋₁₆₀	AADHRQLQLSISCLQQLSLLM
NY-ESO-1₁₅₁₋₁₇₀	SCLQQLSLLMWITQCFLPVF
NY-ESO-1₁₆₁₋₁₈₀	WITQCFLPVFLAQPPSGQRR

Supplemental Table 4: List of anti-HLA class II functional antibodies

Antibody	Clone	Catalog number	Manufacturer	RRID
HLA-DP	B7/21	H260	Leinco Technologies	AB_2737518
HLA-DQ	SPVL3	IM0416	Beckman Coulter	AB_2861134
HLA-DR	G46-6	555809	BD	AB_396143

Supplemental Table 5: List of NY-ESO-1 short peptides for CD8 T-cell stimulation

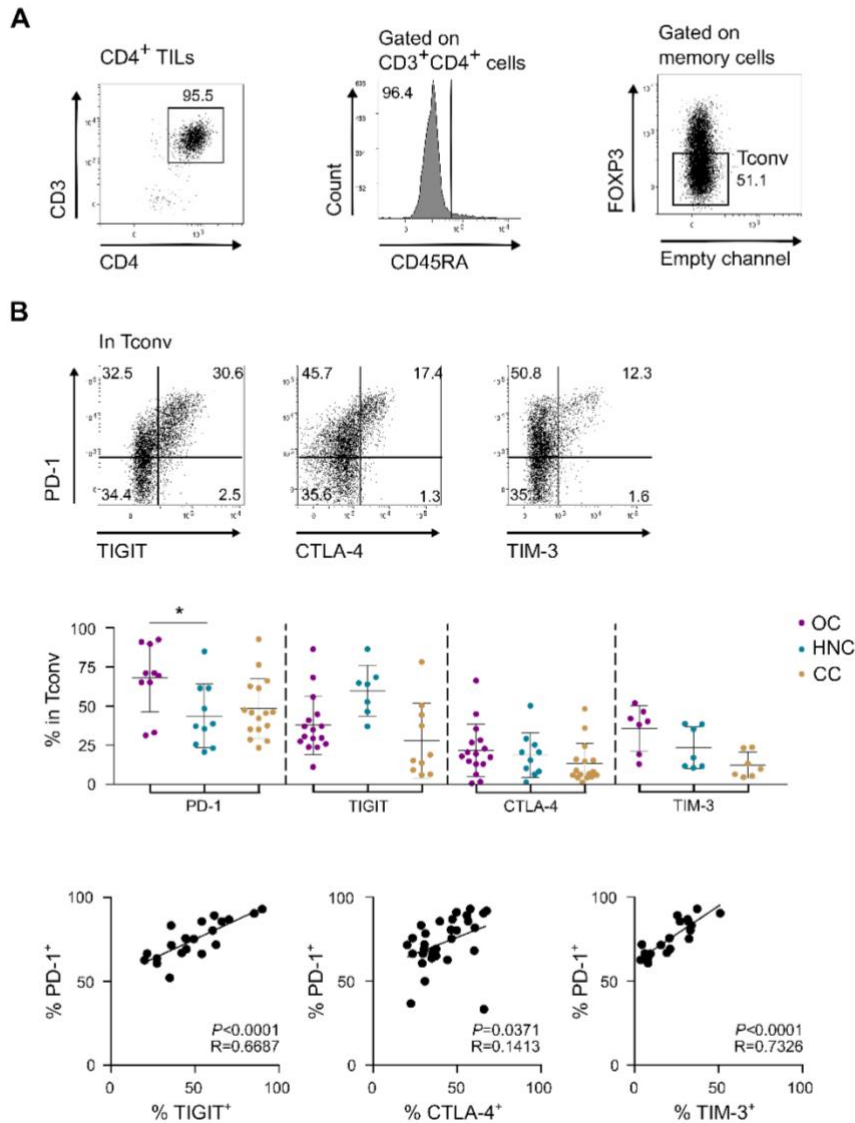
Peptide	Sequence
NY-ESO-1 ₉₂₋₁₀₀	LAMPFATPM
NY-ESO-1 _{157-165A}	SLLMWITQA
NY-ESO-1 ₉₄₋₁₀₂	MPFATPMEA
NY-ESO-1 ₉₄₋₁₀₄	MPFATPMEAE
NY-ESO-1 ₉₆₋₁₀₄	FATPMEAE

Supplemental Table 6: List of HLA class I/peptide multimers

Peptide	HLA	Multimer type	Catalog number	Manufacturer
NY-ESO-1 _{157-165A}	A*0201	Dextramer	WB-3247-PE	Immudex
NY-ESO-1 ₉₄₋₁₀₂	B*3501	Dextramer	WK2701-PE	Immudex
NY-ESO-1 ₉₄₋₁₀₄	B*3501	Dextramer	WK5341-PE	Immudex
NY-ESO-1 ₉₂₋₁₀₀	Cw*0304	Dextramer	WS3694-PE	Immudex
NY-ESO-1 ₉₆₋₁₀₄	Cw*0304	Dextramer	WS5342-PE	Immudex

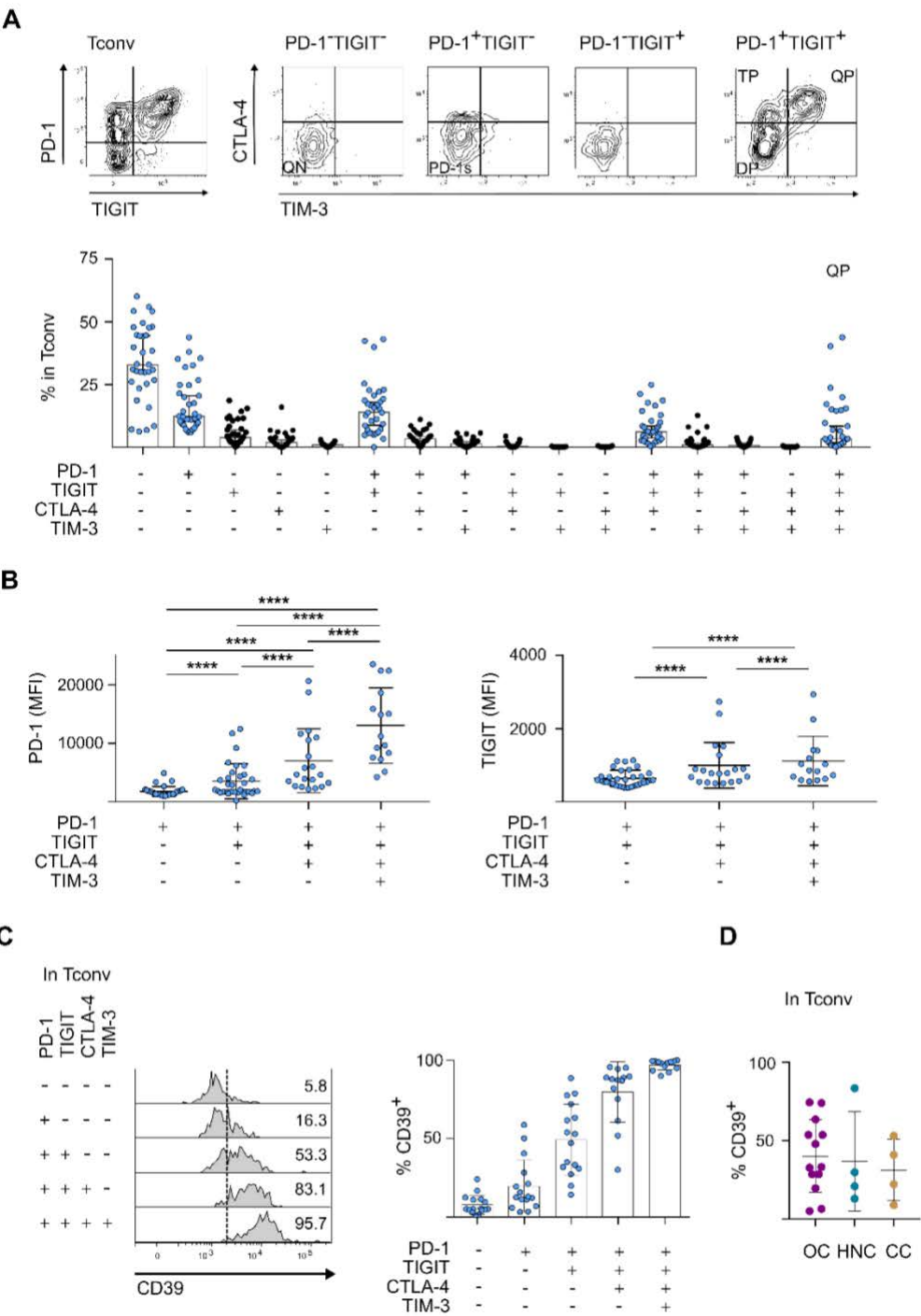
Figures

Supplemental Figure 1



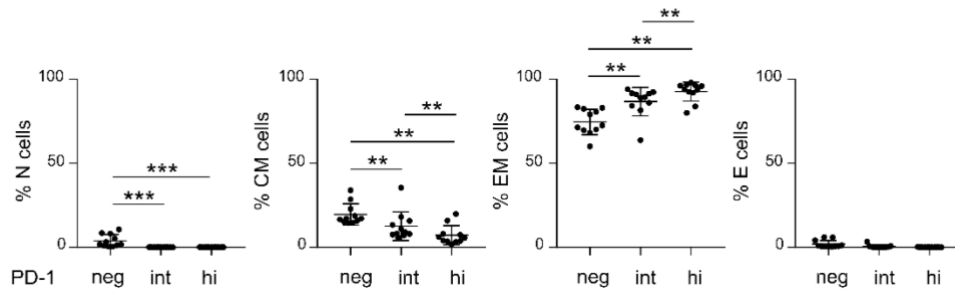
Supplemental Figure 1. Immune checkpoints expression in CD4 Tconv TILs. Isolated CD4⁺ TILs were stained ex vivo with fluorochrome-labeled mAbs specific for CD3, CD4, CD45RA, PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3 and FOXP3 and analyzed by flow cytometry. **(A)** Gating strategy for CD4 Tconv TILs assessment. Left dot plot shows CD3 versus CD4 expression in CD4⁺ TILs, center histogram plot shows CD45RA expression in gated CD3⁺CD4⁺ T cells and right dot plot shows FOXP3 expression in gated memory (CD45RA⁻) CD4⁺ T cells where CD4 Tconv are gated as FOXP3⁻ cells. **(B)** Dot plots show PD-1 versus TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 expression in gated memory CD4 Tconv TILs. Proportions of PD-1⁺, TIGIT⁺, CTLA-4⁺ and TIM-3⁺ cells in CD4 Tconv are summarized for ovarian (OC, $n=10$, purple), head and neck (HNC, $n=16$, green) and cervical (CC, $n=7$, yellow) cancer patients (middle). Correlation between the proportions of PD-1⁺ and those of TIGIT⁺ ($n=19$), CTLA-4⁺ ($n=31$) or TIM-3⁺ ($n=19$) CD4 Tconv TILs from the three tumor types (bottom). Data are presented as mean \pm SD. Mann-Whitney test (middle) and Pearson correlation (bottom) were used to compare variables **(B)**.

Supplemental Figure 2



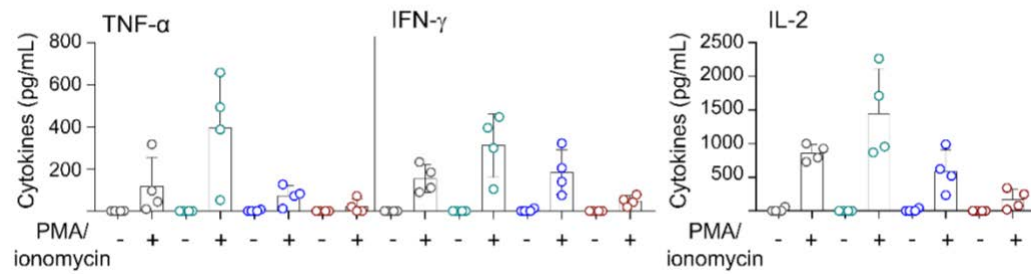
Supplemental Figure 2. Co-expression of immune checkpoints and CD39 defines distinct CD4 Tconv TIL subsets. Isolated CD4⁺ TILs were stained ex vivo with mAbs specific for CD3, CD4, CD45RA, PD-1, TIGIT, CTLA-4, TIM-3, CD39 and FOXP3 and analyzed by flow cytometry. **(A)** Contour plots (right), showing CTLA-4 and TIM-3 expression, are gated on PD-1⁻TIGIT⁻, PD-1⁺TIGIT⁻, PD-1⁻TIGIT⁺ and PD-1⁺TIGIT⁺ CD4 Tconv populations as shown in the left contour plot. Proportions of each of the 16 possible combinations of immune checkpoint (IC) expression are summarized ($n=33$). Tconv TIL subpopulations with a median proportion > 5% are represented in blue. QP, quadruple positive cells expressing the 4 ICs, i.e. PD-1⁺TIGIT⁺CTLA-4⁺TIM-3⁺ Tconv TILs. **(B)** Mean fluorescence intensity (MFI) of PD-1 and TIGIT in CD4 Tconv TIL subpopulations defined in A (with a median proportion > 5%) expressing PD-1 or TIGIT, respectively (numbers of samples are as in A). **(C)** Histogram plots showing CD39 expression in CD4 Tconv TIL subpopulations identified in A as representing > 5% of the total population. Proportions of CD39⁺ cells in each subpopulation are summarized ($n=16$). **(D)** Proportions of CD39⁺ cells in CD4 Tconv are summarized for ovarian (OC, $n=13$, purple), head and neck (HNC, $n=4$, green) and cervical (CC, $n=4$, yellow) cancer patients. Data are presented as mean \pm SD. Wilcoxon test or two-tailed paired test were used to compare variables **(B)**. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

Supplemental Figure 3



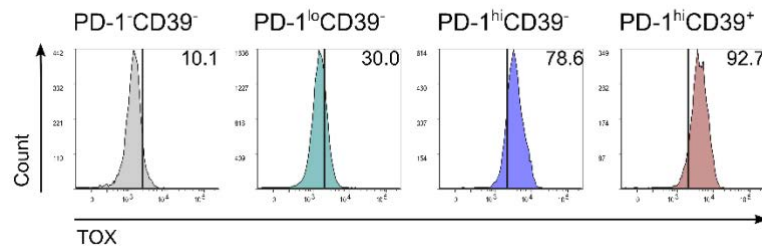
Supplemental Figure 3. PD-1^{hi} CD4 Tconv TILs are effector memory T cells. CD4⁺ TILs were stained ex vivo with mAbs specific for CD3, CD4, CD45RA, CCR7 and PD-1 and the percentages of naïve (N, CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CM, CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (EM, CD45RA⁻CCR7⁻), and effector (E, CD45RA⁺CCR7⁻) cells among PD-1⁻, PD-1^{int} and PD-1^{hi} subsets are represented ($n=11$). Data are presented as mean \pm SD. Wilcoxon test was used to compare variables. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

Supplemental Figure 4



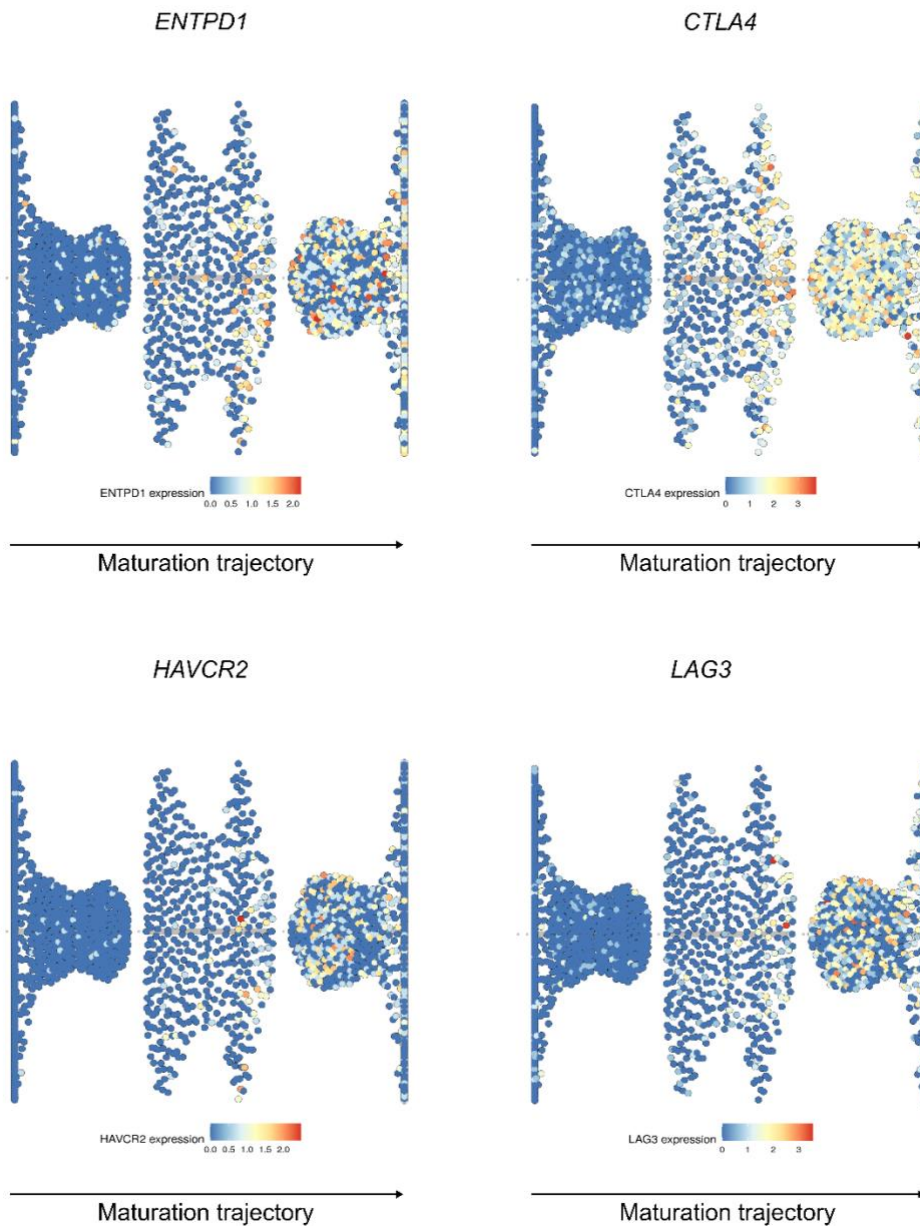
Supplemental Figure 4. PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs have reduced cytokine production capacities. CD4⁺ TILs were stained ex vivo with mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD127, CD25, PD-1 and CD39, and CD4 Tconv (CD3⁺CD8⁻CD4⁺CD25⁻CD127⁺) were sorted into PD-1⁻CD39⁻ (grey), PD-1^{lo}CD39⁻ (green), PD-1^{hi}CD39⁻ (blue) and PD-1^{hi}CD39⁺ (red) subsets that were stimulated or not in vitro with PMA/ionomycin overnight. TNF- α , IFN- γ and IL-2 were quantified by ELISA in the supernatant ($n=4$). Data are presented as mean \pm SD.

Supplemental Figure 5



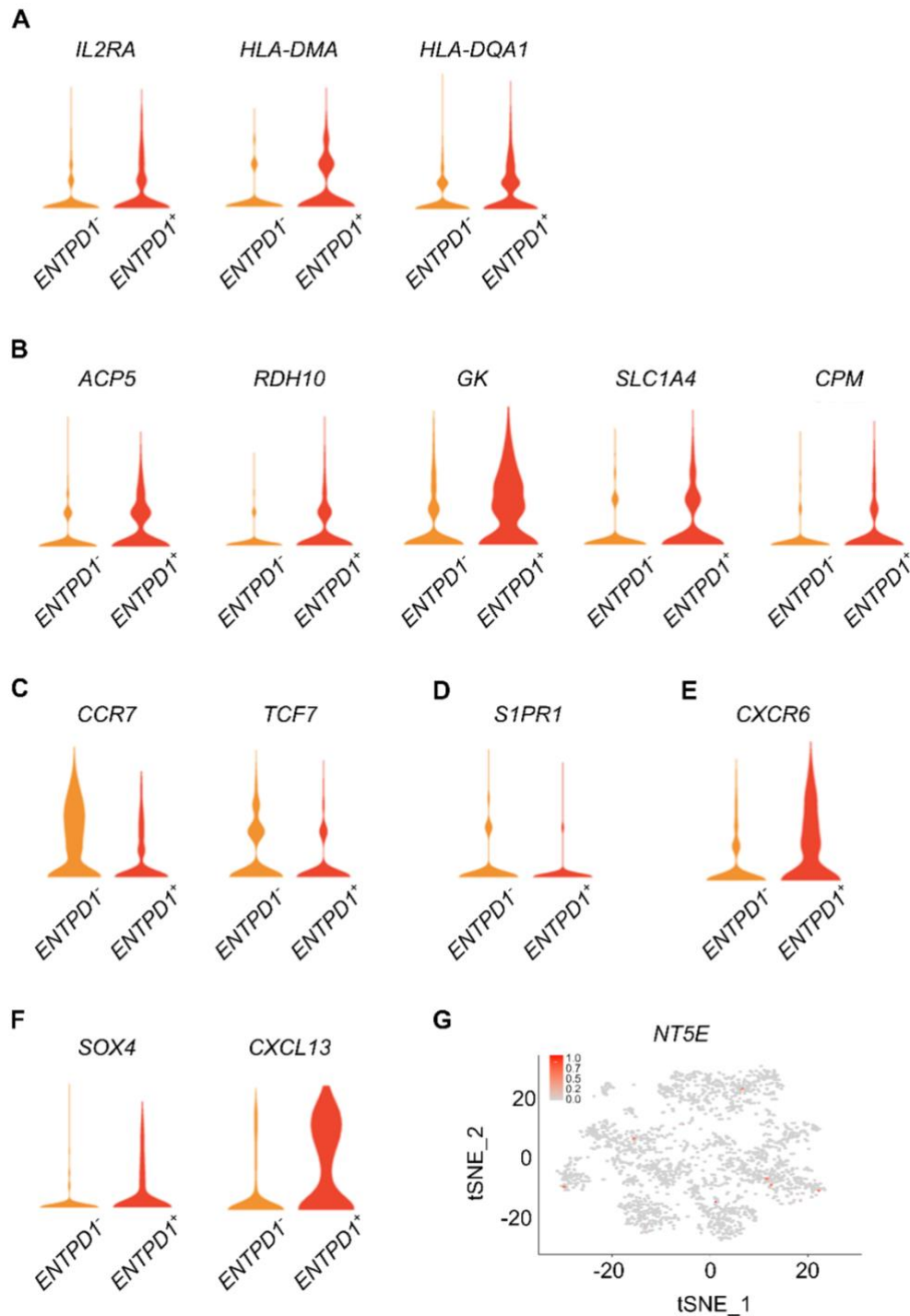
Supplemental Figure 5. TOX expression in CD4 Tconv TIL subsets. Isolated CD4⁺ TILs were stained ex vivo with mAbs specific for CD3, CD4, CD45RA, PD-1, CD39, TOX and FOXP3 and analyzed by flow cytometry. Examples of histogram plots showing TOX expression in CD4 Tconv TIL populations defined according to PD-1 and CD39 expression; PD-1⁻CD39⁻, PD-1^{lo}CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻ and PD-1^{hi}CD39⁺.

Supplemental Figure 6



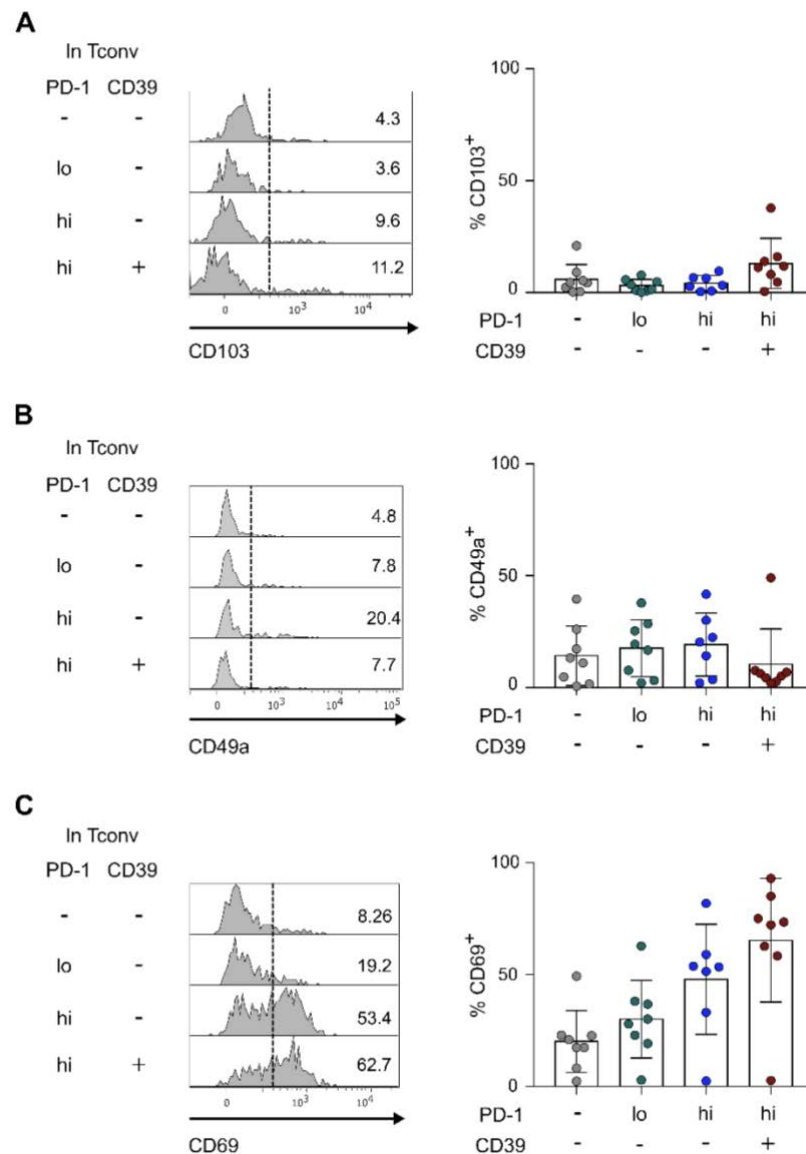
Supplemental Figure 6. Pseudotime analysis of scRNA-seq data. Pseudotime maturation trajectory of CD4 Tconv based on scRNA-Seq data presented in dendrograms color-coded according to *ENTPD1*, *CTLA4*, *HAVCR2* and *LAG3* gene expression levels ($n=4$).

Supplemental Figure 7



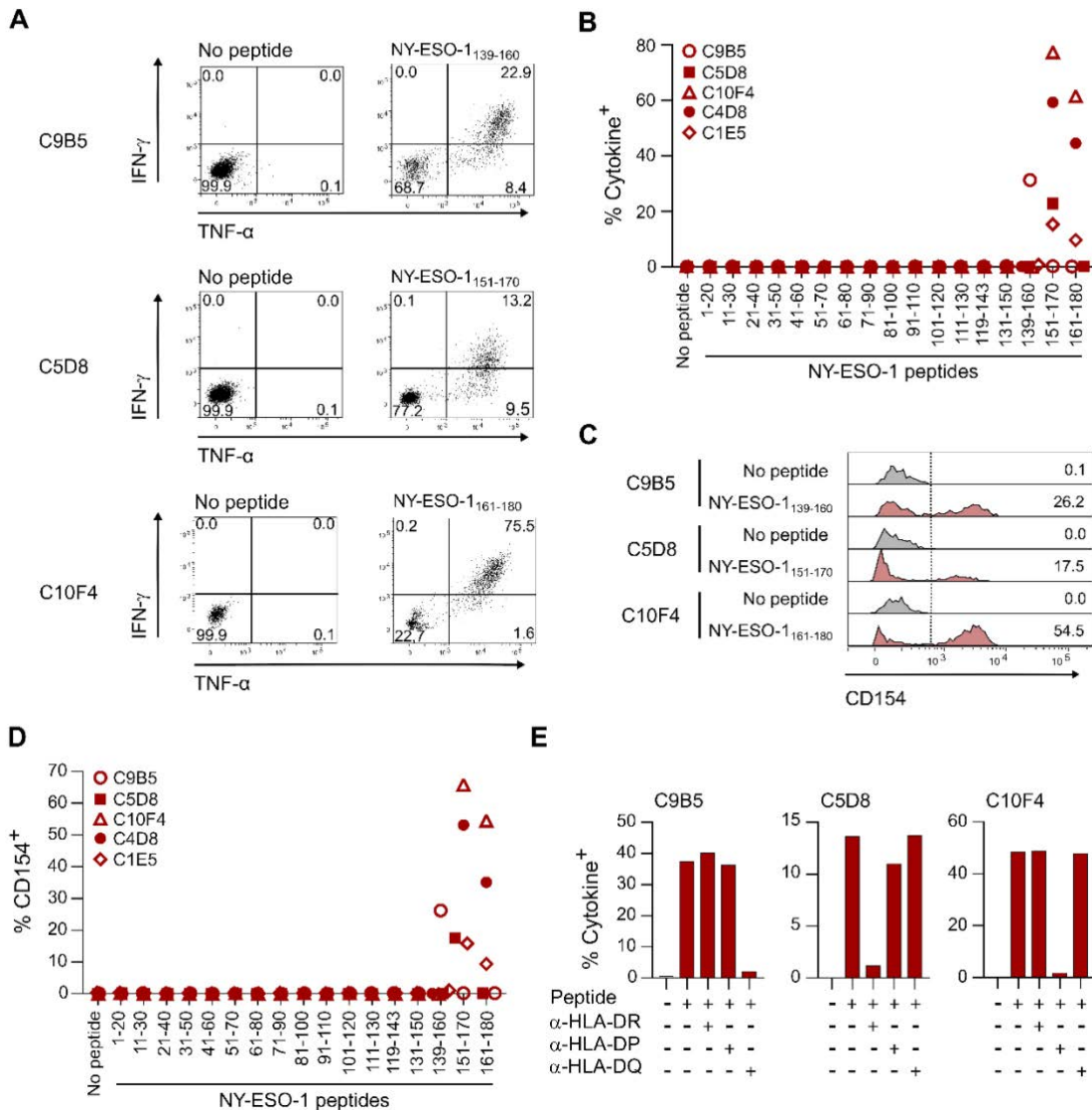
Supplemental Figure 7. *ENTPD1*⁺ CD4 Tconv TILs exhibit features of T-cell activation, late differentiation and tumor residency. Differential gene expression analysis between *ENTPD1*⁺ and *ENTPD1*⁻ CD4 Tconv was performed using scRNA-Seq data (Figure 3B). **(A-F)** Violin plots of expression of 14 genes shown to be significantly differentially expressed in *ENTPD1*⁺ versus *ENTPD1*⁻ CD4 Tconv TILs (n=4). **(G)** t-SNE plot color-coded by levels of expression (grey to red) of *NT5E* (CD73) gene.

Supplemental Figure 8



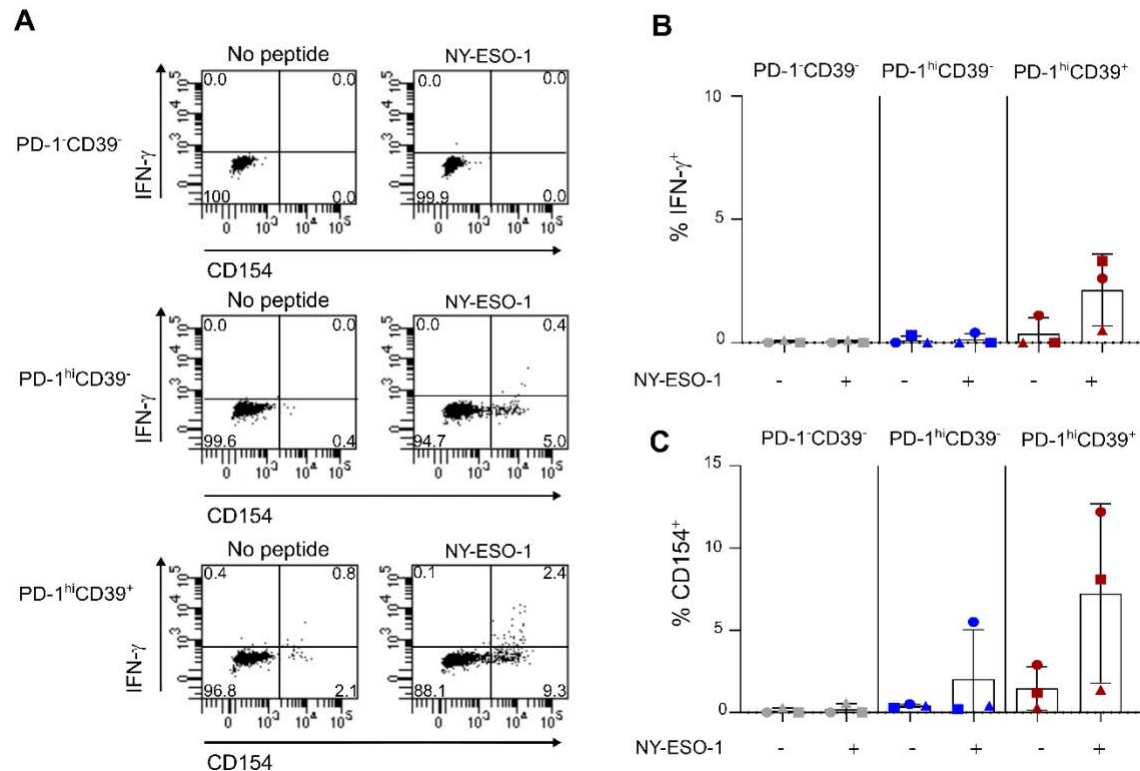
Supplemental Figure 8. Trm markers expression in CD4 Tconv TIL subsets. Isolated CD4⁺ TILs were stained ex vivo with mAbs specific for CD3, CD4, CD45RA, PD-1, CD39, CD49a, CD69, CD103 and FOXP3 and analyzed by flow cytometry. (A-C) Examples of histogram plots showing CD103 (A), CD49a (B) and CD69 (C) expression in CD4 Tconv TIL populations defined according to PD-1 and CD39 expression; PD-1⁻CD39⁻, PD-1^{lo}CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻ and PD-1^{hi}CD39⁺ ($n=8$). Data are presented as mean \pm SD.

Supplemental Figure 9



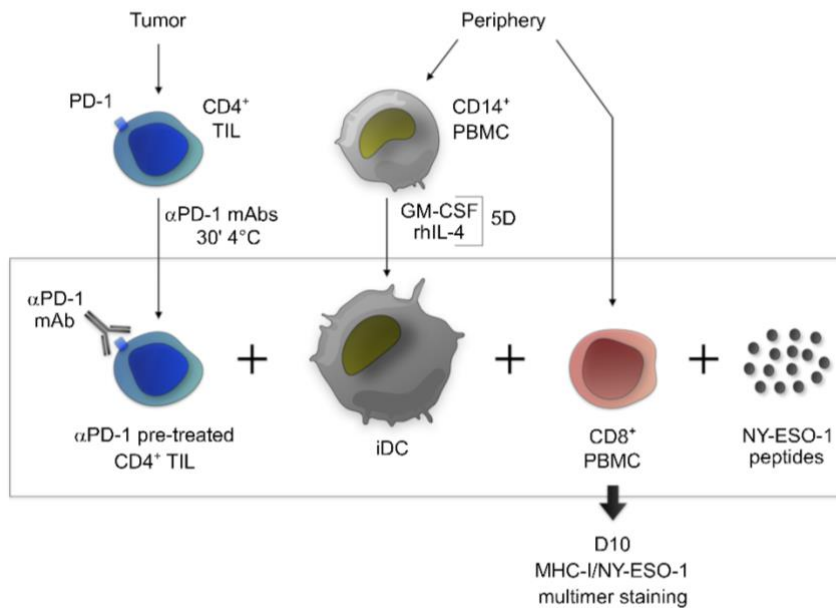
Supplemental Figure 9. Fine specificity and MHC restriction of PD-1^{hi}CD39⁺ Tconv TILs-derived NY-ESO-1-specific clones. (A-D) PD-1^{hi}CD39⁺ CD4 Tconv TILs-derived clones responding to NY-ESO-1 peptide pool (Figure 4C) were stimulated or not with each single peptide for 4 hours in the presence of HLA-matched iDCs from HDs and IFN- γ , TNF- α and CD154 expression were analyzed by intracellular staining and flow cytometry. (A) Examples of dot plots showing IFN- γ versus TNF- α production of the indicated NY-ESO-1-specific clones in the absence or presence of the indicated NY-ESO-1 peptides (B) Proportions of cytokine⁺ (IFN- γ and or TNF- α) cells after stimulation or not of the five NY-ESO-1-specific clones with single NY-ESO-1 peptides (C) Examples of histogram plots showing CD154 expression in the indicated NY-ESO-1-specific clones in the absence or presence of the indicated NY-ESO-1 peptides. (D) Proportions of CD154⁺ cells after stimulation or not of the five NY-ESO-1-specific clones with single NY-ESO-1 peptides. (E) Proportions of cytokine⁺ (IFN- γ and/or TNF- α) cells after stimulation with HLA-matched iDCs from HDs with corresponding NY-ESO-1 single peptides for C9B5, C5D8 and C10F4 clones, in the presence or absence of blocking anti-HLA-DR, anti-HLA-DP and anti-HLA-DQ mAbs. (B,D,E) One experiment representative of two independent experiments.

Supplemental Figure 10



Supplemental Figure 10. Ag specificity of Tconv TIL subsets. Ex vivo isolated CD4 TILs ($n=3$) were stimulated or not for 6 hours with the NY-ESO-1 peptide pool in presence of autologous circulating CD14⁺ cells and IFN- γ and CD154 expression were analyzed by intracellular staining and flow cytometry. **(A)** Dot plots show IFN- γ versus CD154 expression for the PD-1⁻CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻ and PD-1^{hi}CD39⁺ Tconv subsets (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁻) in presence or absence of the NY-ESO-1 peptide pool. **(B, C)** Proportions of IFN- γ ⁺ and CD154⁺ cells in the three subsets are summarized. Data are presented as mean \pm SD.

Supplemental Figure 11



Supplemental Figure 11. Graphical representation of circulating CD8 T-cell stimulation experiment with NY-ESO-1 peptides in the presence of autologous CD4⁺ TILs and iDCs. CD14⁺ cells were sorted from PBMCs of ovarian cancer patients exhibiting antibody and CD8 T-cell responses to the NY-ESO-1 Ag and were differentiated into iDCs by culture for 5 days in the presence of GM-CSF and rhIL-4. At day 5, CD4⁺ TILs were isolated from the same patients, pre-incubated or not with anti-PD-1 mAbs for 30 minutes at 4°C and washed twice. In parallel, autologous circulating CD8 T cells were sorted from PBMCs and co-cultured with iDCs, anti-PD-1 pre-treated or non-pre-treated CD4⁺ TILs in the presence of NY-ESO-1 peptides, as detailed in Materials and Methods, and rhIL-2. At day 10, cells were stained with MHC-I/NY-ESO-1 multimers and analyzed by flow cytometry.

Conclusion

Les résultats de cette étude indiquent que l'épuisement des TIL CD4 est un facteur de réponse au blocage de PD-1. Nous avons identifié un niveau élevé d'expression de PD-1 et l'expression de CD39 comme marqueurs d'épuisement des TIL CD4. Les TIL CD4 PD-1^{hi}CD39⁺ partagent des caractéristiques avec les TIL CD8 épuisés, en particulier l'expression de TOX ainsi que la spécificité pour les Ag tumoraux. La population de TIL CD4 épuisée produit une faible quantité de cytokines en comparaison aux autres TIL CD4, soutenant leur état d'épuisement.

Le blocage de PD-1, spécifiquement sur les TIL CD4, a augmenté la quantité de cytokines produites ainsi que l'expression du CD40L à leur surface après stimulation, ce qui a conduit à une maturation accrue des DC. Dans un modèle basé sur la spécificité à un Ag tumoral, nous avons montré que le blocage de PD-1 sur les TIL CD4 favorisait la prolifération de LT CD8 autologues spécifiques du même Ag. Ceci implique que les TIL CD4 exercent des fonctions d'aide *in situ*, qui pourraient être renforcées par le blocage de PD-1.

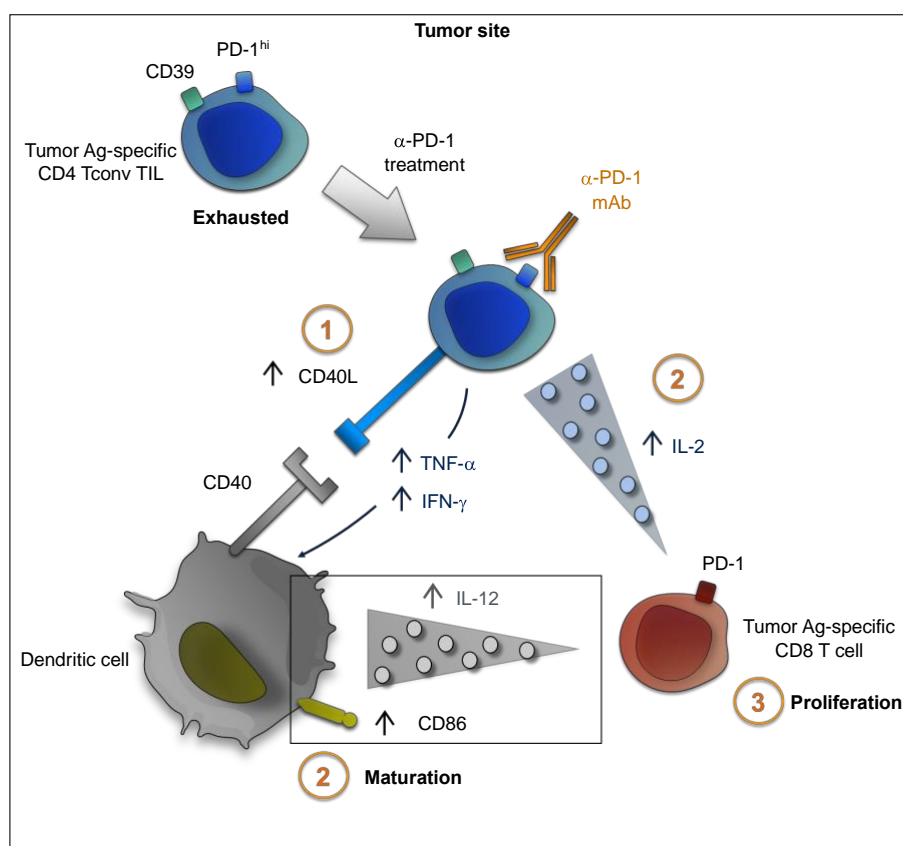


Figure 35 : Analyse des TIL CD4 spécifiques des Ag tumoraux et des mécanismes d'action du blocage de PD-1 sur ces cellules.

III) Analyse phénotypique des $LT_{\gamma\delta}$ infiltrant la tumeur des patients

Contexte

Au-delà des $LT_{\alpha\beta}$ (CD4 et CD8), les $LT_{\gamma\delta}$ ont également une activité anti-tumorale connue basée sur leur potentiel cytotoxique. De plus, leur nombre total dans la tumeur a été associé à un pronostic favorable chez les patients. Cependant, les $TIL_{\gamma\delta}$ sont peu caractérisés et leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale est controversé. En effet, il a été démontré que certains $LT_{\gamma\delta}$ ont une activité pro-tumorale via la production d'IL-17. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser le rôle des différentes sous-populations de $LT_{\gamma\delta}$ dans un contexte tumoral. Le récent intérêt pour les immunothérapies contre le cancer à base de $LT_{\gamma\delta}$ souffre de la rareté des études concernant les $LT_{\gamma\delta}$ *in situ*. En effet, l'état d'épuisement fonctionnel de ces cellules est inconnu.

Les analyses actuelles de séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq), prennent une place de plus en plus importante, notamment pour la caractérisation des TIL CD8. Actuellement, la plupart des études scRNAseq publiées sur les cancers humains se focalisent peu ou mal sur les $TIL_{\gamma\delta}$. En effet, certains $LT_{\alpha\beta}$ ou cellules NK sont susceptibles d'exprimer plusieurs gènes codant pour le $TCR_{\gamma\delta}$, ce paramètre est à prendre en compte. Pour caractériser les profils scRNAseq des $TIL_{\gamma\delta}$ de manière adéquate, il est nécessaire d'utiliser une signature multigénique à la place de gènes uniques.

Une analyse approfondie du compartiment $T_{\gamma\delta}$ dans la tumeur est nécessaire pour appréhender le rôle de ces cellules dans le contrôle de la tumeur. La comparaison des profils transcriptomiques des $LT_{\gamma\delta}$ chez les patients répondeurs ou non à l'immunothérapie pourrait permettre d'identifier leur contribution à l'efficacité du traitement. Il serait également intéressant d'analyser le comportement de ces cellules dans la tumeur et de vérifier s'il suit celui des TIL CD4 et CD8 épuisés.

Résumé

Cette étude vise à améliorer la détection et la purification *in silico* des LT $\gamma\delta$ provenant d'un ensemble de données scRNAseq, en utilisant une nouvelle stratégie de signature multigénique appelée "score and gate". À partir de données de donneurs sains, les trajectoires d'évolution de la différenciation et du potentiel cytotoxique sont tracées pour les LT CD8 et les T $\gamma\delta$ et montrent que ces deux lignées de LT partagent les mêmes dynamiques d'évolution.

Les données scRNAseq de plusieurs tumeurs hématologiques et solides provenant de nombreux patients ont été intégrées aux données contrôles de LT circulants. En effet, les profils transcriptomiques des TIL CD8 et $\gamma\delta$ sont comparés dans les trajectoires préalablement tracées. Les trajectoires des TIL sont similaires à celles des LT circulants, mais des regroupements de cellules dans certaines étapes d'évolution sont observés pour les TIL. Ces regroupements reflètent des marqueurs plus fréquents dans les TIL CD8 et $\gamma\delta$ que dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et correspondent à une résidence tissulaire et un épuisement. De plus, dans chacune des lignées de TIL CD8 et T $\gamma\delta$, les LT épuisés n'étaient pas en différenciation terminale mais plutôt aux stades central mémoire et effecteur mémoire.

Les profils transcriptomiques de TIL CD8 et T $\gamma\delta$ ont été analysés et comparés dans plusieurs ensembles de données scRNAseq de différents types tumoraux. Ces données ont montré que les TIL CD8 et T $\gamma\delta$ s'infiltrèrent dans les tumeurs de manière variable selon les individus et les types de cancer. Cependant, les deux lignées de TIL présentent le même profil transcriptomique en ce qui concerne la différenciation, la cytotoxicité et l'épuisement.

L'étude s'est également étendue à des données scRNAseq avant et après immunothérapie par blocage des PCI. Les réponses CD8 et T $\gamma\delta$ étaient toujours associées. Dans les TIL répondeurs, la thérapie anti-PD-1 a augmenté la proportion de LT épuisés et Trm des lignées CD8 et T $\gamma\delta$.

Ces données scRNAseq reflètent un comportement de différenciation et d'état d'épuisement similaire des TIL CD8 et T $\gamma\delta$ dans plusieurs types de cancers.

Ce projet fait l'objet d'une collaboration, le manuscrit est actuellement en finalisation avant soumission.

Résultats

Ma contribution au projet était de caractériser phénotypiquement les TIL $\gamma\delta$ par marquage *ex vivo* et de comparer leur profil d'épuisement à celui des TIL CD8 chez les patients afin de valider les données obtenues par les analyses scRNASeq. Dans des TIL de cancers des VADS, col de l'utérus et ovaire, j'ai analysé l'expression de PCI et CD39 dans les populations de TIL CD8 et $\gamma\delta$.

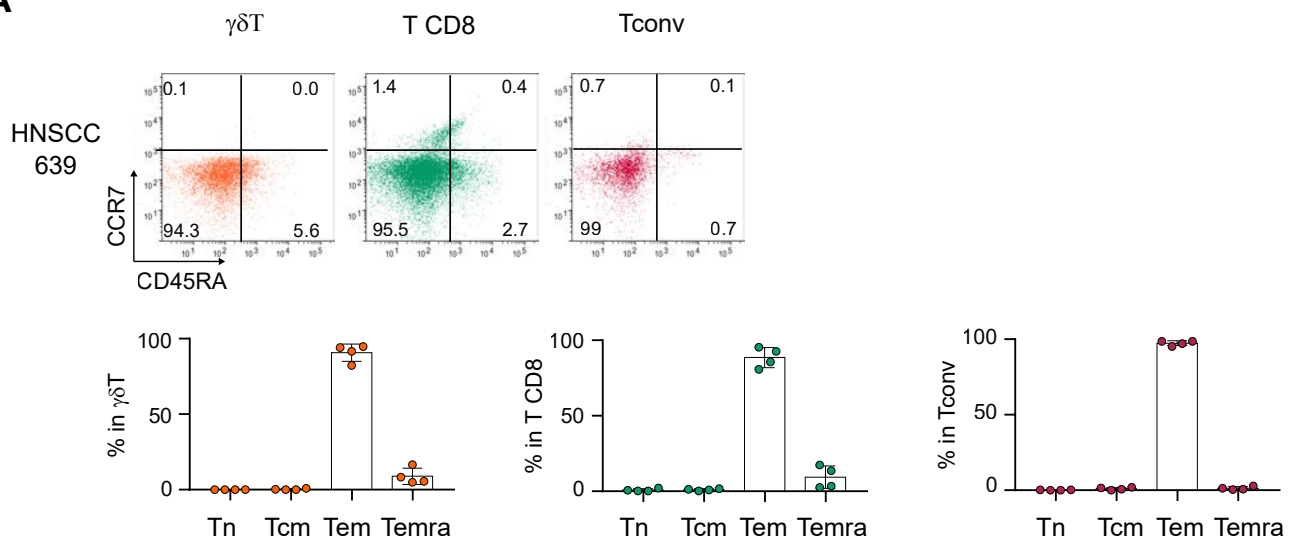
Dans ces échantillons, nous avons analysé le stade de différenciation des TIL $\gamma\delta$ et nous l'avons comparé à celui des TIL CD8 ainsi que celui des TIL CD4 conventionnels afin de faire le lien avec les travaux précédents de ma thèse. Nous avons montré que les TIL $\gamma\delta$ ont globalement le même profil de différenciation que les deux autres lignées, on les retrouve quasiment tous au stade effecteur mémoire (Figure 36, A). Plus précisément, contrairement aux TIL CD4, les TIL CD8 et $\gamma\delta$ contiennent également une faible proportion de LT au stade effecteur.

D'autre part, en accord avec nos travaux précédents, nous avons identifié l'épuisement des TIL CD8 par un niveau élevé d'expression de PD-1 associé à l'expression de TIM-3 (PD-1^{hi}TIM-3⁺) et celui des TIL CD4 Tconv par un niveau élevé d'expression de PD-1 associé à l'expression de CD39 (PD-1^{hi}CD39⁺). Nous avons ensuite analysé l'expression de ces trois marqueurs PD-1, TIM-3 et CD39 dans la population TIL $\gamma\delta$ et les avons comparé avec les deux autres lignées. De manière intéressante, les patients qui présentaient une proportion élevée de TIL CD8 et CD4 épuisés montraient également une proportion élevée de TIL $\gamma\delta$ PD-1^{hi}TIM-3⁺ et PD-1^{hi}CD39⁺ (Figure 36, B). De plus, les proportions de TIL $\gamma\delta$ PD-1^{hi}TIM-3⁺ et PD-1^{hi}CD39⁺ étaient significativement corrélées à la proportion des mêmes populations dans les TIL CD4 et CD8 (Figure 36, C).

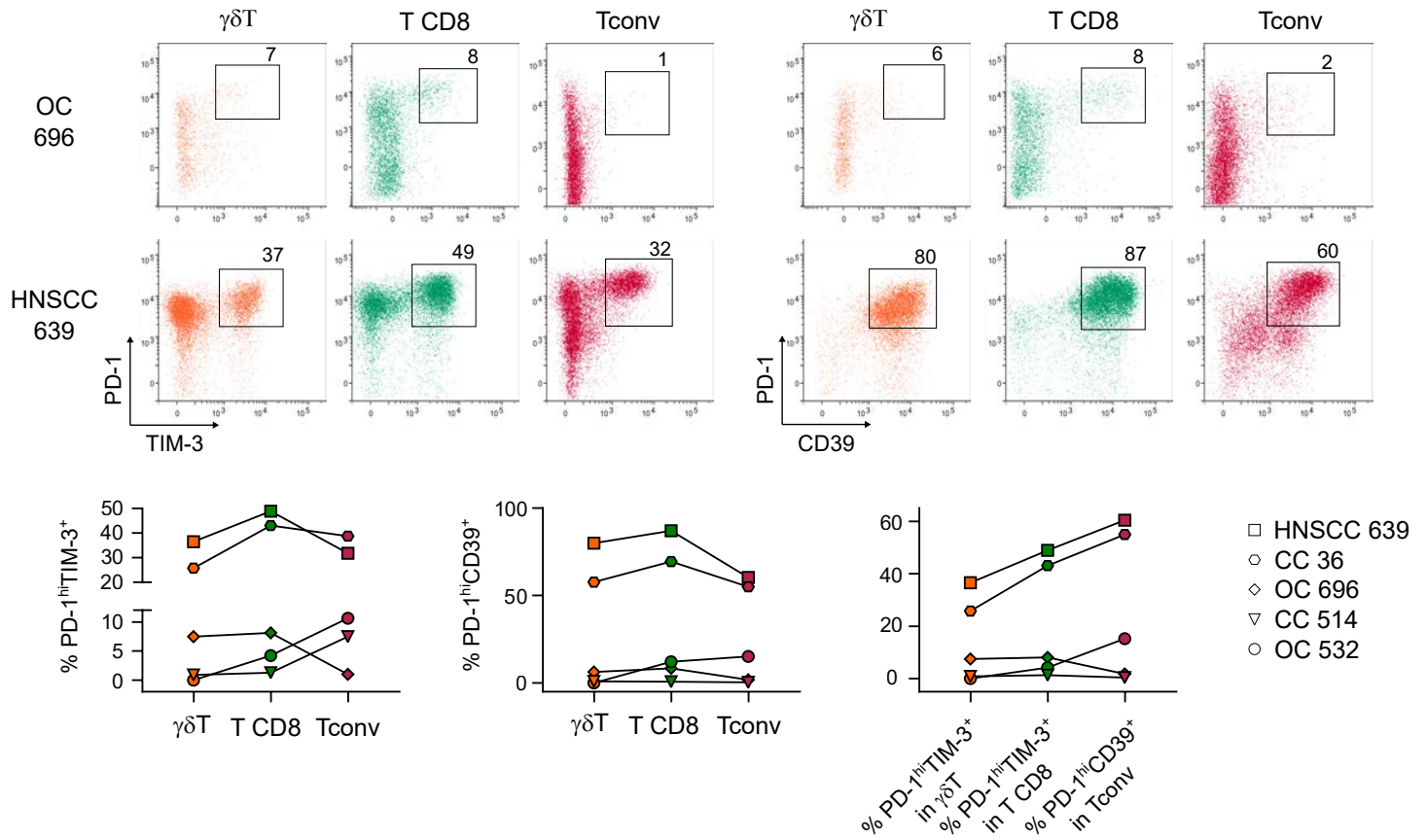
Ces résultats renforcent ceux obtenus suite à l'analyse des données scRNAseq. Pour être en accord avec le projet, qui compare, au niveau transcriptomique, l'épuisement des TIL CD8 et celui des TIL $\gamma\delta$, seuls mes résultats concernant ces deux lignées lymphocytaires sont intégrés à l'article.

Figure 36

A



B



C

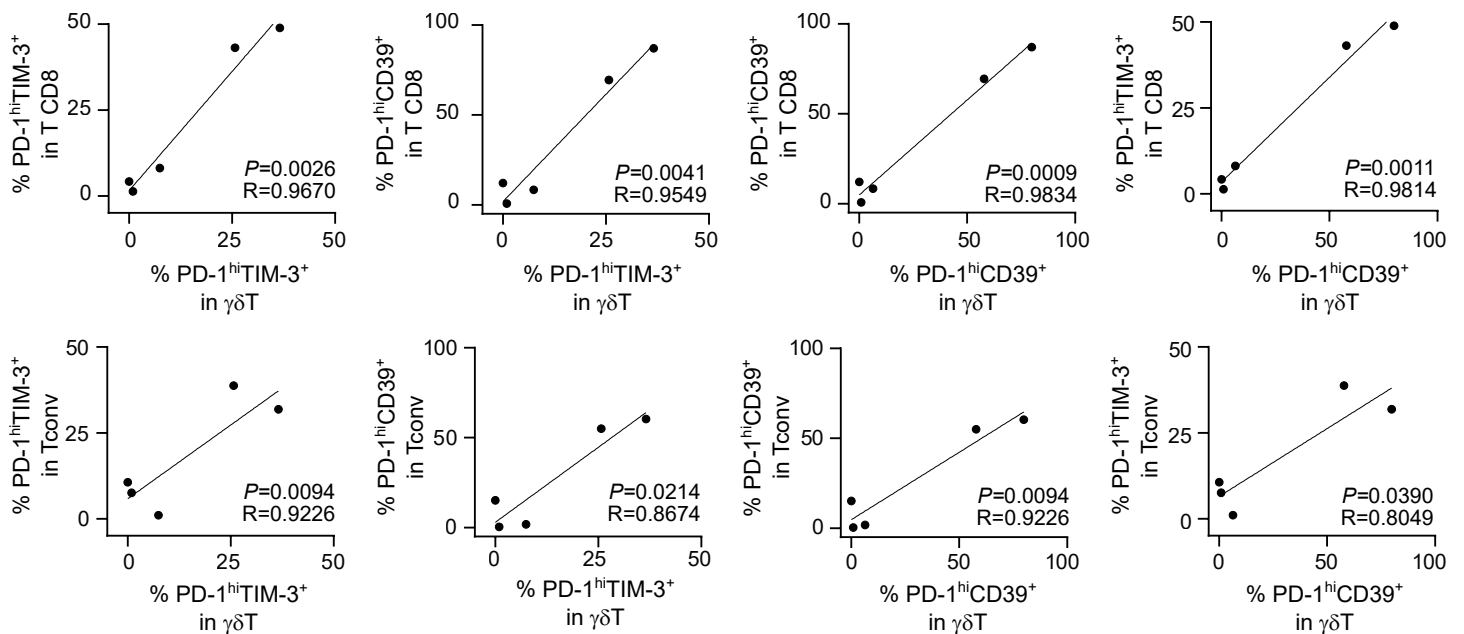


Figure 36 : Comparaison de l'expression des PCI et CD39 dans les TIL $\gamma\delta$, T CD8 et CD4 Tconv.

Les cellules CD45⁺ isolées à partir des échantillons tumoraux étaient marquées *ex vivo* avec les AcM spécifiques pour CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, PD-1, TIM-3, CD39 et PAN $\gamma\delta$ et analysées par cytométrie en flux.

A. Dot plots montrant l'expression de CCR7 versus celle de CD45RA dans les TIL $\gamma\delta$, T CD8 et Tconv provenant d'un patient atteint d'un cancer des VADS (HNSCC). Les proportions de TIL naïfs (Tn), mémoires centraux (Tcm), mémoires effecteurs (Tem) et effecteurs (Temra) sont résumées dans les TIL $\gamma\delta$, T CD8 et Tconv pour les patients atteints de cancer de l'ovaire (OC, $n=1$), cancer du col de l'utérus (CC, $n=2$) et HNSCC ($n=1$). Les TIL $\gamma\delta$ sont sélectionnés comme CD3⁺CD8⁻CD4⁻ ($n=1$) ou CD3⁺PAN $\gamma\delta$ ⁺ ($n=3$). Deux expériences indépendantes.

B. Dot plots montrant l'expression de PD-1 versus celle de TIM-3 (gauche) et PD-1 versus CD39 (droite) dans les TIL $\gamma\delta$, T CD8 et Tconv provenant d'un patient atteint d'un OC (haut) et d'un patient atteint d'un HNSCC (bas). Les proportions de TIL PD-1^{hi}TIM-3⁺ et PD-1^{hi}CD39⁺ sont résumées dans les TIL $\gamma\delta$, sélectionnés comme CD3⁺CD8⁻CD4⁻ ($n=2$) ou CD3⁺PAN $\gamma\delta$ ⁺ ($n=3$), T CD8 et Tconv pour les patients atteints de OC ($n=2$), CC ($n=2$) et HNSCC ($n=1$). Trois expériences indépendantes.

C. Corrélations entre les proportions de TIL PD-1^{hi}TIM-3⁺ ou PD-1^{hi}CD39⁺ dans les TIL T CD8 (haut) et Tconv (bas) et celles de TIL PD-1^{hi}TIM-3⁺ ou PD-1^{hi}CD39⁺ dans les TIL $\gamma\delta$ provenant de 5 patients. Le test de corrélation de Pearson était utilisé pour comparer les variables.

Single-cell differentiation trajectories unveil the coherence of $\gamma\delta$ and CD8 T lymphocytes infiltrating human cancers

Juan Pablo Cerapio,¹⁻⁵ Marion Perrier,^{1-5, 9} Camille-Charlotte Balança,^{1, 2, 4, 9} Pauline Gravelle,^{1-7, 9} Frédéric Pont,^{1-5, 9} Christel Devaud,^{1, 2, 4} Don-Marc Franchini,^{1-6, 8} Virginie Féliu,^{1, 2, 4} Marie Tosolini,¹⁻⁵ Carine Valle,¹⁻⁵ Frédéric Lopez,¹⁻⁵ Anne Quillet-Mary,¹⁻⁶ Loïc Ysebaert,¹⁻⁷ Alejandra Martinez,^{1, 2, 4} Jean Pierre Delord,^{1, 2, 4, 8} Maha Ayyoub,^{1, 2, 4} Camille Laurent,¹⁻⁷ Jean-Jacques Fournie,^{1-6, 10, *}

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Toulouse, France

² Toulouse University, Toulouse, France

³ ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

⁴ Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, Toulouse, France

⁵ Laboratoire d'Excellence 'TOUCAN-2', Toulouse, France

⁶ Institut Carnot Lymphome CALYM

⁷ Centre Hospitalier Universitaire, Toulouse, France

⁸ Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

⁹ These authors contributed equally

¹⁰ Lead Contact

* Correspondence: jean-jacques.fournie@inserm.fr (J.J.F.)

SUMMARY (150 words)

Despite different biologies and antigen specificities, the links of intratumoral $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T CD8 anticancer lymphocytes remain unknown. Here we address this issue by digital extraction and differentiation trajectories of 15,000 $\gamma\delta$ T and 75,000 T CD8 lymphocytes from >150 single-cell RNA sequencing (scRNAseq) datasets of human blood and cancers. Blood $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes from healthy donors similarly differentiate cytotoxic functions while regressing translation profiles. Despite inter-individual variability, these cytolytic T cell compartments remain remarkably coherent in tumors from cancer patients. Tumor infiltrates comprise quantitatively and qualitatively correlated compartments of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs. Their exhausted cells are not terminally differentiated but Tcm and Tem cells, and $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs respond likewise to immune checkpoint blockade therapy. This study provides new insight into $\gamma\delta$ T lymphocyte biology, and the associated resource will prove highly useful for future cancer immunotherapy.

Highlights

- Score and Gate Method for identification of $\gamma\delta$ T lymphocytes from any scRNASeq dataset
- a resource database of $\gamma\delta$ T and T CD8 single cells, genes, and differentiation hallmarks
- translation profiles regress likewise during cytotoxic differentiation of $\gamma\delta$ T and T CD8 cells
- qualitative and quantitative coherence of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs across cancers

Keywords

- transcriptomics
- single-cell RNA sequencing
- gammadelta lymphocytes
- differentiation
- cancer

INTRODUCTION

Cancer immunity relies upon cytolytic T lymphocytes infiltrating tumors (TILs) but beyond cells of the $\alpha\beta$ T CD8 lineage, the presence and function of $\gamma\delta$ TILs remains poorly uncharacterized at a large scale of human cancers. The circulating human $\gamma\delta$ T lymphocytes express a CD4-CD8- (DN) phenotype and a $\gamma\delta$ TCR which TCRV γ 1, TCRV γ 2, or TCRV γ 3 chains are paired with either TCRV γ 9 or TCRV γ 2/3/4/5/8, here termed TCRV γ non9. Most blood $\gamma\delta$ T cells express TCRV γ 9V δ 2 recognizing non-peptide phosphoantigens (Fournié and Bonneville, 1996) inducing BTN2A1/BTN3A1 complexes (Rigau et al., 2020; Karunakaran et al., 2020) to kill cancer cells. In contrast, the other TCRV γ non9V δ 1, TCRV γ non9V δ 3, and TCRV- γ 9V δ non2 $\gamma\delta$ T lymphocytes predominate in extra-lymphoid tissues and recognize other types of diversified antigens. The antitumor role of $\gamma\delta$ T lymphocytes has long been documented (Bonneville et al., 2010; Vantourout and Hayday, 2013; Silva-Santos et al., 2015), but the renewed interest for $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapies (Sebestyen et al., 2019) suffers from still scarce *in situ* studies of $\gamma\delta$ T cells infiltrating human tumors ($\gamma\delta$ TILs). Large transcriptomic meta-analyses from bulk tumor transcriptomes showed the association of total $\gamma\delta$ TILs with favorable outcomes in solid cancers (Gentles et al., 2015). Nevertheless, the inter-individual variation of $\gamma\delta$ TIL infiltrates is considerable and their abundance is not correlated to that of $\alpha\beta$ TILs (Tosolini et al., 2016). Further, the $\gamma\delta$ TILs contribution to cancer patient benefit is controversial (Wu et al., 2014; Meraviglia et al., 2017) and complex, as exemplified by the association of TCRV δ 1 and T CD8, but not of TCRV δ 2, cells with remission in triple negative breast cancer (Wu et al., 2019). Thus little is known about the functional and exhaustion status of $\gamma\delta$ TILs relatively to CD8 TILs, an issue that can be addressed by single scRNAseq.

To characterize the scRNAseq profiles of $\gamma\delta$ TILs however, it is necessary to identify these cells exhaustively and selectively in such complex tissues. Unfortunately, most published scRNAseq studies of human cancers misidentify or do not identify at all $\gamma\delta$ T cells however. Although by definition, only $\gamma\delta$ T lymphocytes express a TCR $\gamma\delta$ at the cell surface, these cells are not the only one to express some levels of either TCR- γ or TCR- δ mRNAs. Both TCR $\alpha\beta$ T CD8 lymphocytes and NK cells also express frequently some but not all of the TCR $\gamma\delta$ -encoding *TRDC*, *TRGC1*, or *TRGC2* genes, imposing use of a multigene signature instead of single genes alone to identify $\gamma\delta$ T lymphocytes with 75% sensitivity and 95% selectivity (Pizzolato et al., 2019).

Here, we significantly improved the detection and digital purification of $\gamma\delta$ T lymphocytes from scRNAseq datasets, using a novel multi-signature 'score and gate' strategy. By extracting the $\gamma\delta$ T and the T CD8 cells likewise from our original and other published scRNAseq datasets of control PBMC and 150 cancer patients, we characterized and compared the functional and exhaustion status of n=15,226 $\gamma\delta$ T and n=74,538 T CD8 lymphocytes from the same samples.

RESULTS

Pseudotimed trajectories of peripheral $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes from control individuals

Like $\alpha\beta$ T lymphocytes (Sallusto et al., 2004; Restifo and Gattinoni, 2013; Pace et al., 2018; Ferreira et al., 2020), the $\gamma\delta$ T lymphocytes differentiate from naïve (Tn) to central memory (Tcm), effector memory (Tem), and terminally differentiated CD45Ra+ effector memory (Temra) cells (Angelini et al., 2004; Caccamo et al., 2005). We extracted $\gamma\delta$ T lymphocytes from PBMC scRNAseq datasets by score and gate (Methods), and analyzed this process by unsupervised inference of a differentiation trajectory. For optimized visualization, we projected the trajectory's two components on the pseudotime axis (Methods). The pseudotime-aligned differentiation trajectory of $n=6,259$ control $\gamma\delta$ T was composed of 14 milestones comprising both TCRV δ 1 and the TCRV δ 2 lymphocytes (Figures 1 a, b). This $\gamma\delta$ T trajectory was anchored by expression of Tn marker genes including the lymph node homing receptor *CCR7* (Girard et al., 2012) and the TCF1-encoding differentiation transcription factor gene *TCF7* (Zhou et al., 2010), which peaked in the M1, M2 milestones and defined the Tn cells. Further M3-M7 milestones displayed intermediate levels of gene expression for Tn and effector markers, a defining hallmark of Tcm lymphocytes (Sallusto et al., 2004; Restifo and Gattinoni, 2013), among which, M6 and M7 upregulated both Tn (*CD27*, *CD28*, *SELL*, *IL7R*) and *CD44*, *CXCR3*, *CXCR4* genes reflecting a capacity for tissue migration. The Tem milestones included activated cells (*IFNG*, *CCL5*) at M10-M11, and further cytotoxic Tem cells (*NKG7*, *PRF1*, *GZMA*, *GZMB*, *GZMM*, *FASLG*) up to M14, in which maximal expression of *FCGR3A* (CD16 marker), *PRF1*, and *GZM* genes defined the Temra cells (Sallusto et al., 2004). The exhaustion transcription factor *TOX* (Khan et al., 2019) and immune checkpoint genes *LAG3*, *TIGIT*, *PDCD1* were weakly expressed in these control $\gamma\delta$ T cells (Figure 1 c). When projected on the trajectory, their single cell scores for Tn, and Teff gene signatures evolved smoothly and in the opposite way, indicating that this trajectory faithfully represented the transcriptional progression from naïve to Temra cells (Figure 1 d). Projecting likewise several published T CD8 differentiation signatures (Table S1) on this trajectory confirmed the assignment of M1-2, M3-7, M8-13, and M14 to Tn, Tcm, Tem, and Temra stages respectively (Figure S1). The dendrogram of these milestones summarized their kinship along differentiation trajectory of blood $\gamma\delta$ T lymphocytes in resting conditions (Figure 1 e).

The pseudotimed MST trajectory of the ($n=3,680$) control T CD8 lymphocytes comprised 15 milestones spanning from the naïve to terminally differentiated cells through comparable gene patterns and pseudotimes. Its Tcm M4 comprised (*IL7R*, *CD28*)-upregulating cells presumably of stem central memory (Tscm) type (Gattinoni et al., 2017; Ferreira et al., 2020) and (*CD95*, *GZMK*, *TOX*, *TIGIT*) Tcm M6 of progenitor exhausted-like (Tpex) type (Galetti et al., 2020). The activated (*IFNG*) Tem cells upregulated *PDCD1* (PD-1) and *LAG3* in Tem M11 and the Temra-specifying *FCGR3A* gene peaked at M15. Projecting on this trajectory the same Tn, Teff (Figure 2 c) and published T CD8

differentiation signatures validated its Tn, Tcm, Tem, and Temra assignments (Figure S2), summarized by the dendrogram of T CD8 milestones (Figure 2 d). To validate these assignments, the $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes from a CITE-seq dataset of healthy donor's PBMC immunostained with differentiation markers (Pont et al., 2020) were extracted as above (Methods) and mapped on their respective trajectory. The gene-based assignments of Tn, Tcm, Tem, and Temra cells of either lineage were consistent with their respective CD45RA and CD62L immunophenotypes (Figure S3), so these data were integrated to the control datasets (Table S2).

In summary, we identified differentiation trajectories and milestones shared by peripheral $\gamma\delta$ T and T CD8 T lymphocytes from healthy adult's peripheral blood.

Pseudotime-associated hallmarks of control $\gamma\delta$ T lymphocytes

Confirming and extending the previous results, the trajectory-based differentially expressed genes (TDEG) (Van den Berge et al., 2020) of control $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes at all milestone transitions were transcriptomic changes of cytotoxic and translation profiles. For more insights on these dynamics, we scored each control $\gamma\delta$ T lymphocyte for all the gene signatures from the MSigDB collection (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>) (Pont et al., 2019), and screened for signatures which scores correlated to $\gamma\delta$ T cell pseudotime. Beyond the 'Teff' and 'Tn' signatures indeed associated with pseudotime (Spearman correlation= 0.87, P=2E-07 and -0.75, P=2E-07, respectively), a few signatures also correlated significantly to pseudotime, either positively or negatively. Consistent with the TDEG, those KEGG, Reactome and GO signatures most correlated to $\gamma\delta$ T cell pseudotime (Spearman correlation =0.73-0.6, P=2E-07) reflected cytotoxic functions ('NK cell cytotoxicity', 'FCGR activation', 'DAP12 signaling') as well as 'Glycolysis' among others (Figure 3 a). Conversely, all the signatures anti-correlated to pseudotime were related to translation, including among others 'Ribosomes', 'Eukaryotic translation initiation', 'Eukaryotic Translation elongation', 'rRNA processing', 'Nonsense-Mediated Decay', 'Selenocysteine metabolism' (Spearman correlation= -0.75 to -0.61) (Table S1). So the transcriptional programs for translation and cytotoxicity evolved inversely during $\gamma\delta$ T cell differentiation (Figures 3 b, S5 a). The control T CD8 lymphocytes the same pseudotime-related hallmarks (Figure S5 b). However, flow cytometry of total mRNA, intracellular ribosomal protein S6, and puromycin incorporation in differentiation stages of control T CD8 lymphocytes did not validate this transcriptional hallmark at the protein level (Figure S5 c). Scarce $\gamma\delta$ Tem cells had increased scores for KEGG's 'TCR signaling pathway' (Table S1) and none scored for the (*PDCD1*, *CTLA4*, *TIM3*, and *TIGIT*) checkpoint signature (Figure 3 c), as expected for resting cell controls. Scanning the MSigDB C3_TFT_Legacy collection of transcription factor signatures pinpointed the involvement of *LEF1*, *IRF1*, and *STAT5B* transcription factors (Table S1) in regulating differentiation of human $\gamma\delta$ T

lymphocytes (Spearman correlation=0.51, 0.59, and 0.73, respectively), as in their murine orthologues (Zuberbuehler et al., 2019).

Hence the transcriptional hallmarks of differentiation in blood $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes are the emergence of their cytotoxic function while their translational profile regresses.

Global hallmarks per cancer type of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs

To assess how $\gamma\delta$ T cell infiltrating human tumors ($\gamma\delta$ TILs) relate to their circulating counterparts, we produced scRNA-seq of malignant lesions from 3 splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and 4 ovarian carcinoma (OVCAR), and we also downloaded published datasets produced on the same platform from 149 additional tumors of lymphoma and solid cancers. Altogether, a total of (n= 7,640) $\gamma\delta$ T and (n= 70,112) T CD8 cells were extracted, and normalized. These encompassed TILs of (n= 4,902) $\gamma\delta$ T and (n= 40,062) T CD8 lineage which were integrated to the above control (n= 7,586) $\gamma\delta$ T and (n= 4,726) T CD8 cells, respectively. For each integrated dataset, a 'public' TIL trajectory was computed with MST (Table S3). With 14 and 15 milestones of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs, respectively (Figure 4 a), these TIL trajectories resembled those of the blood cells (Figures 1,2). The distribution of TILs in their trajectory presented some local concentrations however (Figure S6 a). The consistent embedding of milestones in the trajectory and in the UMAP (Figure S6 b, c), ruled out integration artefacts, implying these concentrations reflected hallmarks, possibly such as tissue residency or exhaustion status, which were more frequent among TILs than among circulating lymphocytes. Signature analyses revealed that in each lineage, the Tex cells were Tcm and mostly Tem cells instead of terminally differentiated effectors (Figure 4 a, c). As compared to their respective non-exhausted TIL counterparts, these Tex shared a signature of 14 up-regulated genes functionally involved in T cell exhaustion (Figure S7 a, b). In both lineages, these Tex were more enriched among the tissue-resident than among the non-resident TILs, and they were also more glycolytic than the non-exhausted cells (Figure S7 c, d). These Tex cells presented the same pseudotime-associated signatures as the control cells (Figure 3), except that the 'Ribosomes' signatures of exhausted $\gamma\delta$ T TILs was no more correlated to pseudotime (Spearman correlation = -0.1). The Tn and early Tcm $\gamma\delta$ TILs had signatures of resting unexpanded clones (tumor singletons (Wu et al., 2020). By contrast, the most mature Tem $\gamma\delta$ T TILs had signatures of non-exhausted mitotic cells from peripherally-expanded large clones (Fairfax et al., 2020), which are associated with clinical response to ICB (Wu et al., 2020; Yost et al., 2019) (Figure 4 b).

Comparing these data across malignancies showed that a contingent of both cytolytic $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes infiltrates tumors, but at variable extents according to cancer type (Figure 5 a). These T cell infiltrates were arbitrarily classified by total cytolytic (T CD8 + $\gamma\delta$ T) TIL counts as deserts (D, <100 TILs), classic (C, 100-1000 TILs), or inflamed (I, >1000 TILs). The tumors most

frequently *D* were LUAD, CTCL, and MEL, whereas those most frequently *I* were HNSCC, BRCA, and OVCAR. The $\gamma\delta$ T-to-T CD8 TIL ratio decreased from desert to inflamed tumors (mean *D*: 24%, *C*:10%, *I*: 5%) (Figure 5 b, Table S4). Overall however, the average cell counts per sample of $\gamma\delta$ TILs correlated to those of T CD8 TILs (Pearson $r = 0.56$). The rates per sample of Tex among $\gamma\delta$ T and Tex among T CD8 TILs were strongly correlated (Pearson $r = 0.78$), and those of Ttrm as well (Pearson $r = 0.77$) (Figure S8 b). Consistent with the extra-lymphoid tropism of TCRV γ non-9/V δ 1 $\gamma\delta$ T lymphocytes, the majority of $\gamma\delta$ TILs, $\gamma\delta$ Ttrm TILs, and $\gamma\delta$ Tex TILs were of TCRV γ non-9 subset (Figure S8 c).

So, tumors are infiltrated by both $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes with similar differentiation hallmarks, including remarkably correlated rates of exhaustion.

Individual hallmarks of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs infiltrating lymphoma

The $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs from each lymphoma were then individually compared. From the 3 SMZL produced for this study, a total of (n=88) $\gamma\delta$ TILs (n=39 TCRV γ 9 plus n=49 TCRV γ non9) were extracted together with (n=912) T CD8 TILs, corresponding to *C*-type infiltrates. These SMZL had consistent compositions of TILs differentiation stages (on average in $\gamma\delta$ T: 0% Tn, 14% Tcm, 86% Tem, 0% Temra; T CD8: 19% Tn, 32% Tcm, 47% Tem, 2% Temra) revealing an enrichment of Tn cells per T CD8 compared to Tn per $\gamma\delta$ T (a pattern named below 'TnEnCD8'). As exemplified by sample SMZL3 (Figure 6 a), in SMZL both lineages had a low Tex rate (3%) despite different Ttrm rates ($\gamma\delta$ T: 4%, T CD8: 21%) (Table S4). From 5 CTCL tumors (Gaydosik et al., 2019), a total of (n=135) $\gamma\delta$ TILs (n=68 TCRV γ 9 plus n=67 TCRV γ non9 cells) and (n=599) T CD8 TILs were extracted. Two out of 5 CTCL had *C* infiltrates with similar compositions (20% Tn, 28% Tcm, 51 Tem, 1% Temra) and high Tex rates in both lineages (31% Tex per $\gamma\delta$ T, 23% Tex per T CD8) (Figure 6a). 23% of $\gamma\delta$ T and 5% of T CD8 were Ttrm (Table S4). The other 3 CTCL were *D*-type (on average n=3 $\gamma\delta$ T and n=3 T CD8 TILs per sample) hampering further investigations. From 22 HL tumor specimens (Aoki et al., 2020), a total of (n=337) $\gamma\delta$ TILs including (n=134 TCRV γ 9 plus n=203 TCRV γ non9 cells) were extracted together with (n=6,296) T CD8 TILs. These figures corresponded to 17 infiltrates of *C* and 5 of *D* type. All the Hodgkin's disease of lymphocyte-rich type (HL-HDLR, n= 1) or nodular sclerosing type (HL-HDNS, n=12) were EBV negative, 11 out of 12 HDNS had *C* infiltrates displaying TnEnCD8 and low Tex rates (4% of T CD8, 13% of $\gamma\delta$ T). Only 1/12 HL-HDNS had a *D* infiltrate. The Hodgkin's disease of mixed cellularity (HL-HDMC, n=9) comprised 6 *C* and 3 *D* infiltrates. Their mixed EBV status unveiled a difference in differentiation: the EBV⁺ specimens had both T cell lineages significantly enriched in Tn and Tem cells, whereas the EBV⁻ ones were enriched in Tcm cells only (χ^2 P=3 E-04 for $\gamma\delta$ T, χ^2 P=2 E-62 for T CD8). The Tex rates in HDMC were low but different according to viral status ($\gamma\delta$ T: 0% in EBV⁺ vs 4% in EBV⁻ and T CD8: 3% in EBV⁺ vs

6% in EBV⁻) (Figure 6 b). All HL samples comprised similar Ttrm rates (7% of the $\gamma\delta$ T and 2% of T CD8) whatever the viral status (Table S4).

Thus in lymphoma, although the differentiation stage of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs may reflect the patient's EBV status, both subsets comprise a correlated fraction of exhausted cells.

Individual hallmarks of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs infiltrating solid tumors

Two datasets of breast carcinoma (BRCA) and triple-negative breast carcinoma (TNBC) were analyzed as above. From 5 BRCA tumors (Azizi et al., 2018), a total of (n=66) $\gamma\delta$ TILs (n=33 TCRV γ 9 plus n=33 TCRV γ non9) were extracted together with (n=5,980) T CD8 TILs, characterizing 4 I and 1 C infiltrates, always with few $\gamma\delta$ TILs (1% of T CD8) and the TnEnCD8 pattern (Wilcoxon P=0.03). Despite similar Ttrm rates in all BRCA (11% $\gamma\delta$ T, 16% T CD8), 4/5 BRCA had low (5%) Tex rates in both lineages and only one (BRCA2) had more Tex in $\gamma\delta$ T than T CD8 (13% $\gamma\delta$ T, 5% T CD8) (Figure 6 c). From the 3 TNBC (Savas et al., 2018), a total of (n=98) $\gamma\delta$ TILs were extracted (n=16 TCRV γ 9 plus n=82 TCRV γ non9, a TCR bias already observed (Wu et al., 2019) together with (n=918) T CD8 TILs. 2 out of 3 TNBC had infiltrates C with cell counts and TnEnCD8 as in BRCA. In both lineages, they had higher rates of Ttrm (48% of $\gamma\delta$ T, 41% of T CD8) (Table S4) and Tex (10% of $\gamma\delta$ T, 34% of T CD8) than BRCA however. One (TNBC3) had a D infiltrate (n=39 T CD8 and n=2 TCRV γ non9 $\gamma\delta$ T TILs) (Figure 6c). From 4 OVCAR (Balança et al., 2020), a total of (n=219) $\gamma\delta$ TILs (n=70 TCRV γ 9 plus n=149 TCRV γ non9) were extracted together with (n=3,279) T CD8 TILs, characterizing 1 D, 1 C, and 2 I infiltrates. The non-desert BRCA had the same TIL composition, including the TnEnCD8 pattern. With nearly 30% and 35% of Tex per $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs, respectively, their Tex rates were highly correlated (Pearson r=0.96). With 26 HNSCC from 18 HPV⁻ and 8 HPV⁺ patients (Cillo et al., 2020), a total of (n=948) $\gamma\delta$ TILs (n=367 TCRV γ 9 plus n=581 TCRV γ non9) were extracted together with (n=9,152) T CD8 TILs, corresponding to 3 I, 19 C, and 4 D infiltrates. All HNSCC had a rather similar composition with high Tex (20%) and Ttrm rates (46% $\gamma\delta$ T, 26% T CD8) in both lineages (Table S4). Different from HL, their virological status affected neither the infiltration extent, nor the differentiation and exhaustion of their TILs (Figure 6 d). From 5 HCC (Zheng et al., 2017), a total of (n=788) $\gamma\delta$ TILs (n=348 TCRV γ 9 plus n=329 TCRV γ non9) and (n=4,414) T CD8 TILs were extracted, identifying 4 C and 1 I infiltrates. The 4 C comprised comparable TIL counts, composition, and Ttrm rates in each lineage (30% $\gamma\delta$ T, 39% T CD8), but while 3 of these HCC had similar low Tex rates (~10%) among $\gamma\delta$ T and T CD8, the other HCC displayed very divergent Tex rates in the two lineages (2% $\gamma\delta$ T, 29% T CD8) (Table S4). The inflamed HCC4 (n=1,783 T CD8 and 384 $\gamma\delta$ T) was composed like the other HCC: with TnEnCD8, high Ttrm (~60%) but low low Tex (2%) rates in both lineages. From 11 BCC (Yost et al., 2019), a total of (n=48) $\gamma\delta$ TILs (n=30 TCRV γ 9 plus n=18 TCRV γ non9) and (n=3,198) T CD8 TILs were

extracted, characterizing 4 *D*, 6 *C* and 1 *I* infiltrates. The *D* infiltrates (~2 $\gamma\delta$ T TILs plus 41 T CD8 per sample) were not characterized further. The *I* tumor (BCC9, [Figure 7 a](#)) comprised mostly T CD8 (n=1368, including 14% Tn, 27% Tcm, 53% Tem, 6% Temra and 13% Tex cells) but very few $\gamma\delta$ TILs (n=6, including n= 2 Tex). Likewise, all the *C* infiltrates had also scarce $\gamma\delta$ T TILs (n=277 T CD8 and n=6 $\gamma\delta$ T cells) per sample, hence Tex were only among T CD8 (7%). From 18 MEL ([Sade-Feldman et al., 2018](#)), a total of (n=21) $\gamma\delta$ TILs (n=8 TCRV γ 9 276 plus n=13 TCRV γ non9) and (n=1,548) T CD8 TILs were extracted, characterizing 10 *D* and 8 *C* infiltrates. The too few cells hampered the characterization of *D*, but the *C* infiltrates comprised on average 17% Tn, 36% Tcm, 42% Tem, 4% Temra, 0.5% Ttrm, and 32% Tex cells among the T CD8 together with scarce $\gamma\delta$ TILs (1% compared to T CD8) as in BCC ([Table S4](#)). From 35 LUAD samples available in two studies ([Lambrechts et al., 2018](#); [Kim et al., 2020](#)) a total of (n=1,472) $\gamma\delta$ T (n=614 TCRV γ 9 and n=858 TCRV γ non9) and (n=5,418) T CD8 were extracted, characterizing 13 classic and 21 desert infiltrates. With about 33% of $\gamma\delta$ TILs (range 0-200%) relative to T CD8, the LUAD were the most enriched in $\gamma\delta$ TILs in this study. Aside of Tn γ CD8 in 19 of these LUAD, the differentiation stages and Tex rates of both lineages (mean $\gamma\delta$ T: 8%, T CD8: 12%) were correlated (Pearson r=0.8).

So in human tumors, TILs of the $\gamma\delta$ T and T CD8 lineages comprise correlated rates of transcriptionally-defined exhausted cells.

To validate these conclusions, we obtained tumor biopsies from untreated ovarian cancer (OVCAR, n=2), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC, n=1) and cervical cancer (CC, n=2) patients, these specimens were dissociated and the cell surface protein hallmarks of their $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs were analyzed by *ex vivo* immunostaining and flow cytometry. Consistent with the scRNAseq data, these tumors comprised on average 12% of $\gamma\delta$ T relative to T CD8 TIL (range: 4.3-26.4%) composed of 90% Tem cells with CCR7-CD45RA⁻ phenotype in both lineages ([Figure S9 a](#)). In these epithelial malignancies, the tumor antigen-specific Tex CD8 TILs are highly cytotoxic PD-1^{hi}TIM-3⁺ cells associated with better survival and clinical responses to ICB ([Balança et al., 2020](#)). Since they co-express both immune checkpoints, CD39 and Trm markers, these features were analyzed at the cell surface of the $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs from these tumors ([Figure S9 b](#)), and the Tex rates per TILs were classified as low (n=3) or high (n=2) ([Methods](#)). The patients with high Tex TILs rates per T CD8 had also high Tex TIL rates per $\gamma\delta$ T, and those with low Tex CD8 TIL rates also had low Tex $\gamma\delta$ TILs rates. Furthermore, across all samples, the rates of PD-1^{hi}TIM-3⁺ and PD-1^{hi}CD39⁺ cells per CD8 TIL and per $\gamma\delta$ T TIL were correlated ([Figure S9 c](#)). So in human tumors, the cell surface differentiation and exhaustion of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs were correlated phenotypically. Furthermore, the PD-1^{hi}TIM-3⁺ Tex cells from $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs were also evidenced by *ex vivo* immunophenotyping of TILs from a murine model of orthotopic HNSCC tumor ([Figure S9 d](#)). In these mice, the same 5 out of 16 possible co-expression patterns of the PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3

immune checkpoints (Balança et al., 2020) predominated among the $\gamma\delta$ T and the T CD8 TILs (Figure S9 e).

Collectively, these data confirmed that the tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes evolve correlated rates of exhausted cells.

$\gamma\delta$ TILs respond as T CD8 to ICB therapy

These results prompted us to investigate whether $\gamma\delta$ T respond like T CD8 TILs to ICB therapy across two published datasets of 21 tumors from BCC (n= 11) (Yost et al., 2019) and MEL (n= 10) (Sade-Feldman et al., 2018) patients sampled before and after ICB treatment. These datasets were analyzed as above and in relation to tumor infiltrate's reactivity to ICB (Methods) and patient's clinical response. Neither of $\gamma\delta$ T and/or T CD8 TIL counts, pre-treatment infiltration level, or tumor infiltrate reactivity to treatment did correlate alone to the clinical responses of patients. Although the post-treatment TIL counts increased (n=13, on average 2.3-fold) or decreased (n=8, on average 0.3-fold), the responses of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs were correlated (Pearson $r = 0.75$). In reactive infiltrates, the anti-PD-1 therapy increased the Tex and Ttrm cells in both T CD8 and $\gamma\delta$ T lineages (Figure 7 a), confirming (Yost et al., 2019). The pre-treated lesions were less infiltrated in MEL than in BCC (mean: 86 versus 295 TILs, respectively) and these MEL infiltrates were less reactive (MEL: 4/10 reactive, means: 73 (pre)/149 (post); BCC: 8/11 reactive, means: 306 (pre) /785 (post)). The scarcity of $\gamma\delta$ TILs in MEL hampered further conclusions, but after treatment with ipilimumab plus nivolumab, the desert infiltrate of the clinical responder MEL006 presented higher counts of both $\gamma\delta$ T, T CD8, and of their respective Tex and Ttrm cells (Figure 7 b).

Thus, regardless of the clinical outcome of patients, both $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes infiltrating MEL and BCC tumors respond to ICB treatment.

DISCUSSION

All emerging anticancer strategies based on $\gamma\delta$ T lymphocytes capitalize on their distinct and HLA-unrestricted antigen specificity, broad tissue distribution, and cytotoxicity for malignant cells (Sebestyen et al., 2019). But whether $\gamma\delta$ T cells infiltrate tumors independently of T CD8 cells, whether they differentiate cytotoxic function and get exhausted like conventional T lymphocytes, and finally respond to ICB remained unknown. By combining digital extraction and trajectory analyses from a large collection of tumor scRNAseq datasets, here we showed that $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes infiltrating cancer lesions present the same differentiation hallmarks as in healthy adult blood. Although they penetrate tumors variably across individuals and cancers, both cell types progressively differentiate a cytotoxic capacity while reducing their translational profile. Hence the cytolytic T cell contingent infiltrating tumors is generally composed of both $\gamma\delta$ T and T CD8 lineages at different

abundances (1:10) but similar differentiation stages. Notably, both comprise a subset of exhausted cells and respond to ICB therapy, regardless of clinical outcomes of patients.

Pseudotime is a quantity measuring each cell's progression along a continuous series of differentiation states, and a transform of true chronological time probably through not-constant scales (Alpert et al., 2018; Trapnell et al., 2014; Van den Berge et al., 2020). How explicit time is quantitatively converted into T cell pseudotime remains to be precisely determined, but the related sizes of the $\gamma\delta$ T and T CD8 trajectories suggests that the time transform is the same for both lineages. Furthermore, 'public' trajectories computed from several donors's cells allow to track a differentiation pathway more extensively than any private (computed from one single individual's cells) trajectory alone. So the public trajectories of human $\gamma\delta$ T and T CD8 differentiation built here from >100 individuals' samples represents a unique resource to further map newer such cells from other scRNAseq datasets. Our further methodological developments will aim at directly projecting further $\gamma\delta$ T and T CD8 cells on these public trajectories, such as to deduce directly their corresponding hallmarks.

The differentiation dynamics of peripheral $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes reflects the transcriptomic emergence of their cytotoxic function paralleled by the decrease of their translational profile. Determining the genes which translation drops when T cell differentiate into cytotoxic effectors was out of the scope of this study. Nevertheless, in T CD8 cells of mice acutely infected with lymphocytic choriomeningitis virus, such translational changes occur upon antigen activation, and selectively target genes encoding for effector T cell differentiation (Araki et al., 2017). In T lymphocytes, the TCR activation induces stress granules, molecular motors and microtubule dynamics to regulate likewise the translation of immune checkpoints mRNA (Franchini et al., 2019; Curdy et al., 2019). Hence this differentiation-translation relationship is a general hallmark extending beyond T lymphocytes and presumably hematopoietic cells, since it exists in the intestine epithelium (Moor et al., 2017).

The public trajectory of T CD8 differentiation presented here is in agreement with earlier diffusion maps for such TILs from HNSCC (Cillo, 2020) and with Monocle2 trajectories for those from BCC (Yost et al., 2019), CRC (Zhang et al., 2018), NSCLC (Guo et al., 2018), and HCC (Zheng et al., 2017). Consistent with the Tcm and Tem differentiation stages of Tex we evidenced here, the 2 clusters of exhausted CD8 TILs previously reported in HNSCC (Cillo et al., 2020) and deemed terminally differentiated (Guo et al., 2018; Azizi et al., 2018) were not Temra cells (Figures 6, S9). Furthermore, the exhausted CD8 TILs from head and neck, cervical, and ovarian cancers present a cell surface phenotype of Tem cells (Balança et al., 2020). Although exhaustion is a dysfunctional state distinct from the functional effector or memory T cell states (Henning et al., 2018; Thommen and Schumacher, 2018), their chromatin accessibility patterns (Scott-Browne et al., 2016) and our

data indicate that in tumor microenvironments, exhaustion arises from these stages of T cell differentiation rather than from Temra. Private trajectories provide snapshots of such ongoing differentiation biases. Other examples of biases include the effector memory $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes enrichment seen in EBV⁺ HL patients and the frequent enrichment of naive T CD8 cells among TILs, recently assigned to non-recirculating small clones named tumor singletons (Wu et al., 2020).

The present discovery of a quantitative and qualitative association of $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes infiltrating most cancer lesions was unexpected, since earlier transcriptomic deconvolutions of human cancers showed a dissociation of $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ T lymphocytes in tumors (Gentles et al., 2015; Tosolini et al., 2017; Meraviglia et al., 2017). This discrepancy reflects not only the higher resolution of scRNAseq transcriptomics than inferences from microarray bulk deconvolutions, but also the difference between T CD8 and total $\alpha\beta$ T cells, as TILs prominently comprise T CD4 cells. Nevertheless, the coordination of $\alpha\beta$ T and T CD8 TILs we found here suggests an orchestration possibly mediated by a BTN3A1-mediated mechanism (Payne et al., 2020). Furthermore, since T lymphocytes differentiation follows antigenic activation, the advanced differentiation stages of $\alpha\beta$ TILs question whether like T CD8, they were specifically stimulated by tumor mutation-encoded peptide neoantigens or rather by tumor metabolites such as phosphoantigens (Fournié and Bonneville, 1996). Also, the exhaustion rates of intratumoral $\alpha\beta$ T and T CD8 lymphocytes reflect persistent TCR triggering and microenvironmental exposure to inducers of exhaustion in both cases. Consequently, the coordinated responses of both cells types to checkpoint blockade therapies support further their tight association in cancer. However, neither T CD8 TILs pre- or post-treatment (Tumeh et al., 2014; Chen and Mellman, 2013) nor their exhaustion status (Daud et al., 2016; Riaz et al., 2017; Prat et al., 2017) suffice alone to predict the clinical responses of patients, the immunological responses of $\alpha\beta$ T and T CD8 alone or together did not correlate either. Besides of immunotherapy-induced changes in functional state of TILs (Efremova et al., 2018), the anatomical location of metastases, and tumor mutation of the IFN γ signaling or antigen-presentation pathways (Patel et al., 2017) are among the many parameters of therapeutic responses. Nevertheless, here, the recurrent accrual of TCRV γ 9 $\gamma\delta$ TILs in post-ICB tumors lacking such cells before treatment suggests they actively participate to the cancer immunity cycle (Chen and Mellman, 2013), whereby therapeutic antibodies trigger the replenishment of tumor lesions with fresh non-exhausted lymphocytes from peripheral blood (Wu et al., 2020).

Overall, our study contributes to the understanding of $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating human cancers, and serves as a fundamental framework and essential resource for future cancer immunotherapy targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the supplemental information section of this paper and include the following:

- [KEY RESOURCES TABLE](#)
- [CONTACT FOR RESOURCE SHARING](#)
 - Materials availability
 - Data availability
 - Software availability
- [EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS](#)
 - Human tissue samples
 - Mice
- [METHOD DETAILS](#)
 - Cells and flow cytometry
 - Single cell RNA sequencing
- [QUANTIFICATION AND STATISTICAL DETAILS](#)
 - scRNA-seq data pre-processing and QC
 - Gene annotations
 - Integration of PBMC scRNASeq datasets
 - Single cell signatures and scores
 - Score and Gate of $\gamma\delta$ T and T CD8 cells from PBMC
 - TCR subtyping by compensated scores of TCRV γ 9 and TCRV γ non9 cells
 - Validation of the Score and Gate method of digital extraction
 - Extraction of TILs from public scRNAseq datasets of tumor samples
 - Trajectory Inference
 - Pseudotimed trajectories
 - Heatmaps
 - Classifications
 - Data visualization

Acknowledgements

We acknowledge F. Dieli for critical comments on the manuscript, C Steidl for facilitating access to HL datasets and CRCT colleagues for helpful discussions. This work was granted access to the HPC resources of CALMIP supercomputing center under the allocation 2020-T19001. We are also grateful to the Genotoul bioinformatics platform (Bioinfo Genotoul, Toulouse Midi-Pyrenees) for providing computing resources. This work was supported in part by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Toulouse III-Paul Sabatier, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and supporting grants from the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN-2, contract ANR11-LABX), Institut Carnot Lymphome (CALYM), the Fondation ARC (PGA1-RF2019-0208691), and Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole (contract CIEL).

Author Contributions

J.J.F. conceived and designed the study, J.P.C. conceived methods, processed and performed bioinformatic data analyses, generated figures, and wrote the manuscript. M.P. and F.P. conceived algorithms. P.G., C.C.B., A.Q.M. and C.V. produced original scRNAseq data, C.C.B., P.G. and D.M.F. performed flow cytometry analyses. C.D. and V.F. generated and analyzed murine models. M.T. and F.L. supervised scRNAseq analyses and provided valuable methodological discussions. L.Y., A.M., J.P.D. and C.L. prepared and annotated clinical samples. C.L., M.A. and J.J.F. supervised the study and wrote the paper.

Declaration of Interests

Authors declare no relevant conflict of interest.

REFERENCES

- Alfei, F., Kanev, K., Hofmann, M., Wu, M., Ghoneim, H.E., Roelli, P., Utzschneider, D.T., von Hoesslin, M., Cullen, J.G., Fan, Y., *et al.* (2019). TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* 571, 265-269.
- Alpert, A., Moore, L.S., Dubovik, T., and Shen-Orr, S.S. (2018). Alignment of single-cell trajectories to compare cellular expression dynamics. *Nat Methods* 15, 267-270.
- Angelini, D.F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., Poupot, R., Bernardi, G., Poccia, F., Fournie, J.J., and Battistini, L. (2004). Fc γ RIII discriminates between two subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 104, 1801-1807.
- Aoki, T., Chong, L.C., Takata, K., Milne, K., Hav, M., Colombo, A., Chavez, E.A., Nissen, M., Wang, X., Miyata-Takata, T., *et al.* (2020). Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Disease-Defining T-cell Subsets in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discov* 10, 406-421.
- Araki, K., Morita, M., Bederman, A.G., Konieczny, B.T., Kissick, H.T., Sonenberg, N., Ahmed, R., (2017). Translation is actively regulated during the differentiation of CD8⁺ effector T cells. *Nature Immunology* 18, 1046-1057.
- Azizi, E., Carr, A.J., Plitas, G., Cornish, A.E., Konopacki, C., Prabhakaran, S., Nainys, J., Wu, K., Kiseliovas, V., Setty, M., *et al.* (2018). Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell* 174, 1293-1308 e1236.
- Balanca, C.C., Scarlata, C.M., Michelas, M., Devaud, C., Sarradin, V., Franchet, C., Martinez Gomez, C., Gomez-Roca, C., Tosolini, M., Heaugwane, D., *et al.* (2020). Dual Relief of T-Lymphocyte Proliferation and Effector Function Underlies Response to PD-1 Blockade in Epithelial Malignancies. *Cancer Immunol Res* 8, 869-882.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467-478.
- Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature Biotechnology* 36, 411-420.
- Caccamo, N., Meraviglia, S., Ferlazzo, V., Angelini, D., Borsellino, G., Poccia, F., Battistini, L., Dieli, F., and Salerno, A. (2005). Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol* 35, 1764-1772.
- Chen, D.S., Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39,1-10.
- Chihara, N., Madi, A., Kondo, T., Zhang, H., Acharya, N., Singer, M., Nyman, J., Marjanovic, N.D., Kowalczyk, M.S., Wang, C., *et al.* (2018). Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* 558, 454-459.
- Cillo, A.R., Kurten, C.H.L., Tabib, T., Qi, Z., Onkar, S., Wang, T., Liu, A., Duvvuri, U., Kim, S., Soose, R.J., *et al.* (2020). Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity* 52, 183-199 e189.
- Connors, J.M., Cozen, W., Steidl, C., Carbone, A., Hoppe, R.T., Flechtner, H.H., and Bartlett, N.L. (2020). Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Dis Primers* 6, 61.
- Curdy, N., Lanvin, O., Laurent, C., Fournié, J.J., Franchini, D.M. (2019). Regulatory mechanisms of inhibitory immune checkpoint receptors expression. *Trends in Cell Biology* 29, 777-790.
- Daud, A.I., Loo, K., Pauli, M.L., Sanchez-Rodriguez, R., Sandoval, P.M., Taravati, K., Tsai, K., Nosrati, A., Nardo, L., Alvarado, M.D., *et al.* (2016). Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest* 126, 3447-3452.
- Efremova, M., Rieder, D., Klepsch, V., Charoentong, P., Finotello, F., Hackl, H., Hermann-Kleiter, N., Löwer, M., Baier, G., Krogsdam, A., *et al.*, (2018). Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution. *Nature communications* 9, 1-13.
- Fairfax, B.P., Taylor, C.A., Watson, R.A., Nassiri, I., Danielli, S., Fang, H., Mahe, E.A., Cooper, R., Woodcock, V., Traill, Z., *et al.* (2020). Peripheral CD8(+) T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 26, 193-199.
- Fournie, J.J., and Bonneville, M. (1996). Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. *Res Immunol* 147, 338-347.
- Franchini, D.M., Lanvin, O., Tosolini, M., de Campaigno, E.P., Cammas, A., Pericart, S., Scarlata, C.M., Lebras, M., Rossi, C., Ligat, L., *et al.*, (2019). Microtubule-driven stress granule dynamics regulate inhibitory immune checkpoint expression in T cells. *Cell Reports* 26, 94-107.

- Galletti, G., De Simone, G., Mazza, E.M.C., Puccio, S., Mezzanotte, C., Bi, T.M., Davydov, A.N., Metsger, M., Scamardella, E., Alvisi, G., *et al.* (2020). Two subsets of stem-like CD8(+) memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. *Nat Immunol* 21, 1552-1562.
- Gattinoni, L., Speiser, D.E., Lichterfeld, M., and Bonini, C. (2017). T memory stem cells in health and disease. *Nat Med* 23, 18-27.
- Gaydosik, A.M., Tabib, T., Geskin, L.J., Bayan, C.A., Conway, J.F., Lafyatis, R., and Fuschiotti, P. (2019). Single-Cell Lymphocyte Heterogeneity in Advanced Cutaneous T-cell Lymphoma Skin Tumors. *Clin Cancer Res* 25, 4443-4454.
- Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S.V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., *et al.* (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 21, 938-945.
- Girard, J.P., Moussion, C., and Forster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12, 762-773.
- Guo, X., Zhang, Y., Zheng, L., Zheng, C., Song, J., Zhang, Q., Kang, B., Liu, Z., Jin, L., Xing, R., *et al.* (2018). Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med* 24, 978-985.
- Henning, A.N., Roychoudhuri, R., Restifo, N.P., (2018). Epigenetic control of CD8+T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 18, 340-348.
- Karunakaran, M.M., Willcox, C.R., Salim, M., Paletta, D., Fichtner, A.S., Noll, A., Starick, L., Nohren, A., Begley, C.R., Berwick, K.A., *et al.* (2020). Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the Vgamma9Vdelta2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity* 52, 487-498 e486.
- Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiew, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., *et al.* (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature* 571, 211-218.
- Kim, N., Kim, H.K., Lee, K., Hong, Y., Cho, J.H., Choi, J.W., Lee, J.I., Suh, Y.L., Ku, B.M., Eum, H.H., *et al.* (2020). Single-cell rna sequencing demonstrates the molecular and cellular reprogramming of metastatic lung adenocarcinoma. *Nature communications* 11, 1-15.
- Kumar, B.V., Ma, W., Miron, M., Granot, T., Guyer, R.S., Carpenter, D.J., Senda, T., Sun, X., Ho, S.H., Lerner, H., *et al.* (2017). Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep* 20, 2921-2934.
- Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwe, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., *et al.* (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat Med* 24, 1277-1289.
- McInnes, L., and Healy, J. (2018). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. In *ArXiv*.
- Meraviglia, S., Lo Presti, E., Tosolini, M., La Mendola, C., Orlando, V., Todaro, M., Catalano, V., Stassi, G., Cicero, G., Vieni, S., *et al.* (2017). Distinctive features of tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* 6, e1347742.
- Moor, A.E., Golan, M., Massasa, E.E., Lemze, D., Weizman, T., Shenhav, R., Baydatch, S., Mizrahi, O., Winkler, R., Golani, O., *et al.* (2017). Global mRNA polarization regulates translation efficiency in the intestinal epithelium. *Science* 357, 1299-1303.
- Pace, L., Goudot, C., Zueva, E., Gueguen, P., Burgdorf, N., Waterfall, J.J., Quivy, J.P., Almouzni, G., Amigorena, S. (2018). The epigenetic control of stemness in CD8+ T cell fate commitment. *Science* 359, 177-186.
- Pais-Ferreira, D.P., Silva, J.G., Wyss, T., Marraco, S.A.F., Scarpellino, L., Charmoy, M., Maas, R., Siddiqui, I., Tang, L., Joyce, J.A., *et al.* (2020). Central memory CD8+ T cells derive from stem-like tcf7hi effector cells in the absence of cytotoxic differentiation. *Immunity* 53, 985-1000 e11.
- Patel, S.J., Sanjana, N.E., Kishton, R.J., Eidizadeh, A., Vodnala, S.K., Cam, M., Gartner, J.J., Jia, L., Steinberg, S.M., Yamamoto, T.N., *et al.* (2017). Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature* 548, 537-542.
- Payne, K.K., Mine, J.A., Biswas, S., Chaurio, R.A., Perales-Puchalt, A., Anadon, C.M., Costich, T.L., Harro, C.M., Walrath, J., Ming, Q., *et al.*, (2020). Bttn3a1 governs antitumor responses by coordinating $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells. *Science* 369, 942-949.
- Pizzolato, G., Kaminski, H., Tosolini, M., Franchini, D.M., Pont, F., Martins, F., Valle, C., Labourdette, D., Cadot, S., Quillet-Mary, A., *et al.* (2019). Single-cell RNA sequencing unveils the shared and the distinct cytotoxic hallmarks of human TCRVdelta1 and TCRVdelta2 gammadelta T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 11906-11915.
- Pont, F., Tosolini, M., and Fournie, J.J. (2019). Single-Cell Signature Explorer for comprehensive visualization of single cell signatures across scRNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res* 47, e133.

- Pont, F., Tosolini, M., Gao, Q., Perrier, M., Madrid-Mencía, M., Huang, Tse S., Neuvial, P., Ayyoub, M., Nazor, K., and Fournié, J.-J. (2020). Single-Cell Virtual Cytometer allows user-friendly and versatile analysis and visualization of multimodal single cell RNAseq datasets. *NAR Genomics and Bioinformatics* lqaa025, <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa025>.
- Prat, A., Navarro, A., Pare, L., Reguart, N., Galvan, P., Pascual, T., Martinez, A., Nuciforo, P., Comerma, L., Alos, L., *et al.* (2017). Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma. *Cancer Res* 77, 3540-3550.
- Restifo, N.P., Gattinoni, L. (2013). Lineage relationship of effector and memory T cells. *Current Opinion in Immunology* 25, 556-563.
- Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W.J., Sims, J.S., Hodi, F.S., Martin-Algarra, S., Mandal, R., Sharfman, W.H., *et al.* (2017). Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 171, 934-949 e916.
- Rigau, M., Ostrouska, S., Fulford, T.S., Johnson, D.N., Woods, K., Ruan, Z., McWilliam, H.E.G., Hudson, C., Tutuka, C., Wheatley, A.K., *et al.* (2020). Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells. *Science* 367.
- Sade-Feldman, M., Yizhak, K., Bjorgaard, S.L., Ray, J.P., de Boer, C.G., Jenkins, R.W., Lieb, D.J., Chen, J.H., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., *et al.* (2018). Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* 175, 998-1013 e1020.
- Saelens, W., Cannoodt, R., Todorov, H., and Saeys, Y. (2019). A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat Biotechnol* 37, 547-554.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.
- Savas, P., Virassamy, B., Ye, C., Salim, A., Mintoff, C.P., Caramia, F., Salgado, R., Byrne, D.J., Teo, Z.L., Dushyanthen, S., *et al.* (2018). Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med* 24, 986-993.
- Scott-Browne, J.P., López-Moyado, I.F., Trifari, S., Wong, V., Chavez, L., Rao, A., Pereira, R.M. (2016). Dynamic changes in chromatin accessibility occur in CD8+T cells responding to viral infection. *Immunity* 45, 1327-1340.
- Sebestyen, Z., Prinz, I., Dechanet-Merville, J., Silva-Santos, B., and Kuball, J. (2020). Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discov* 19, 169-184.
- Silva-Santos, B., Serre, K., Norell, H. (2015). $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 15, 683-691.
- Stoeckius, M., Hafemeister, C., Stephenson, W., Houck-Loomis, B., Chattopadhyay, P.K., Szwedlow, H., Satija, R., and Smibert, P. (2017). Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* 14, 865-868.
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W.M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., and Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888-1902 e1821.
- Tosolini, M., Algans, C., Pont, F., Ycart, B., and Fournie, J.J. (2016a). Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. *Oncoimmunology* 5, e1188246.
- Tosolini, M., Algans, C., Pont, F., Ycart, B., and Fournie, J.J. (2016b). Large scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology in press*.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., and Rinn, J.L. (2014). The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 32, 381-386.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., *et al.* (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571.
- Van den Berge, K., Roux de Bezieux, H., Street, K., Saelens, W., Cannoodt, R., Saeys, Y., Dudoit, S., and Clement, L. (2020). Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. *Nat Commun* 11, 1-13.
- Vantourout, P., Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology* 13, 88-100.
- Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., *et al.* (2014). Gamma deltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 40, 785-800.
- Wu, T.D., Madireddi, S., de Almeida, P.E., Banchereau, R., Chen, Y.J., Chitre, A.S., Chiang, E.Y., Iftikhar, H., O'Gorman, W.E., Au-Yeung, A., *et al.* (2020). Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature* 579, 274-278.

- Wu, Y., Kyle-Cezar, F., Woolf, R.T., Naceur-Lombardelli, C., Owen, J., Biswas, D., Lorenc, A., Vantourout, P., Gazinska, P., Grigoriadis, A., *et al.* (2019). An innate-like Vdelta1(+) gammadelta T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Science translational medicine* 11.
- Yost, K.E., Satpathy, A.T., Wells, D.K., Qi, Y., Wang, C., Kageyama, R., McNamara, K.L., Granja, J.M., Sarin, K.Y., Brown, R.A., *et al.* (2019). Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med* 25, 1251-1259.
- Zhang, L., Yu, X., Zheng, L., Zhang, Y., Li, Y., Fang, Q., Gao, R., Kang, B., Zhang, Q., Huang, J.Y., *et al.* (2018). Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer. *Nature* 564, 268-272.
- Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., *et al.* (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 169, 1342-1356 e1316.
- Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229-240.
- Zuberbuehler, M.K., Parker, M.E., Wheaton, J.D., Espinosa, J.R., Salzler, H.R., Park, E., and Ciofani, M. (2019). The transcription factor c-Maf is essential for the commitment of IL-17-producing gammadelta T cells. *Nat Immunol* 20, 73-85.

FIGURES

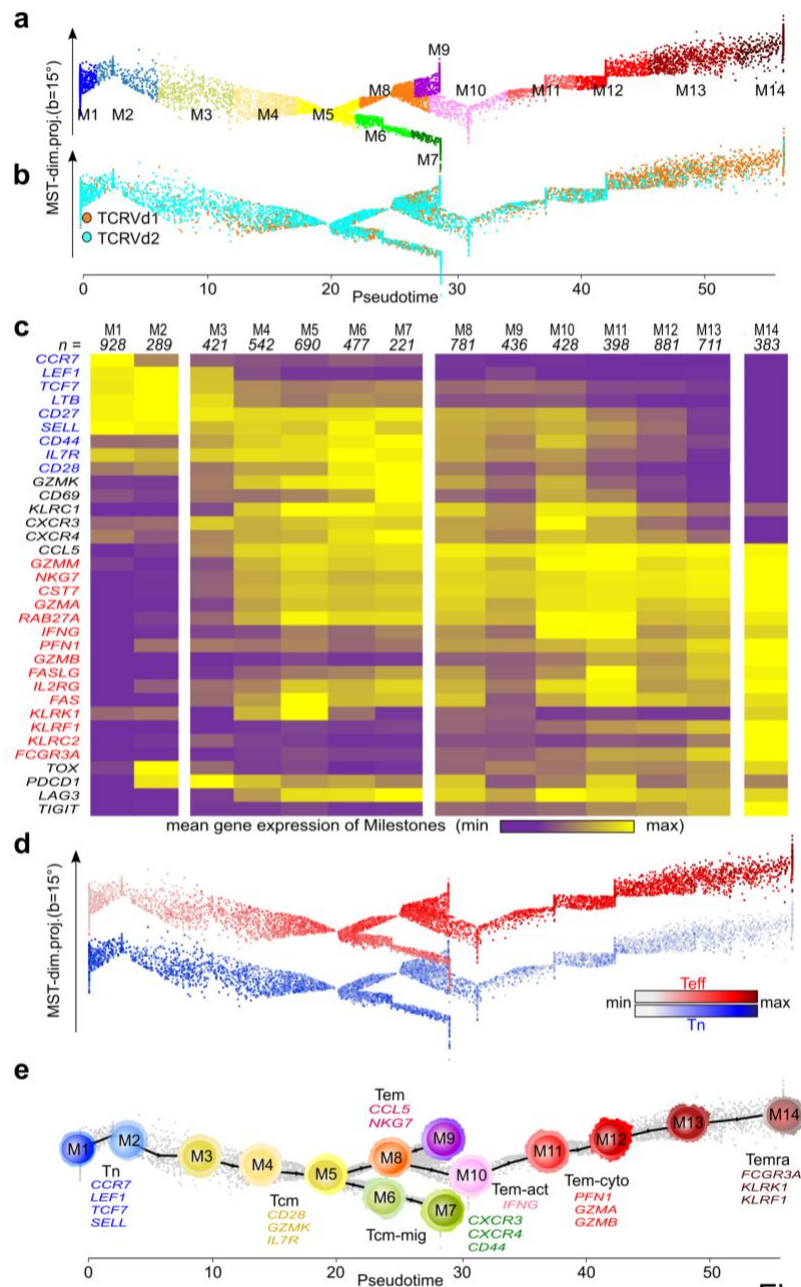


Figure 1: Pseudotemporal MST trajectory of differentiation of $\gamma\delta$ T lymphocyte controls

a, Each extracted $\gamma\delta$ T cell is shown on the MST trajectory using as (x,y) coordinates its pseudotime, and a projection through angle β on pseudotime axis of MST dimensions 1 and 2. Cell color key: pseudotime-ordered milestones. **b**, Same as above showing distribution on the trajectory of the previously purified TCRV δ 1 and TCRV δ 2 cells. **c**, Mean of gene expression level per milestone. Genes shown blue and red are included in the Tn and Teff signatures, respectively. **d**, Single cell scores for Tn and Teff signatures across the $\gamma\delta$ T trajectory. **e**, Pseudotime-based milestones dendrogram overlaid to the trajectory showing $\gamma\delta$ T cells (grey dots), milestones (colours), trajectory (dark line), and differentiation direction (arrows). Differentiation stages and selected marker genes are specified.

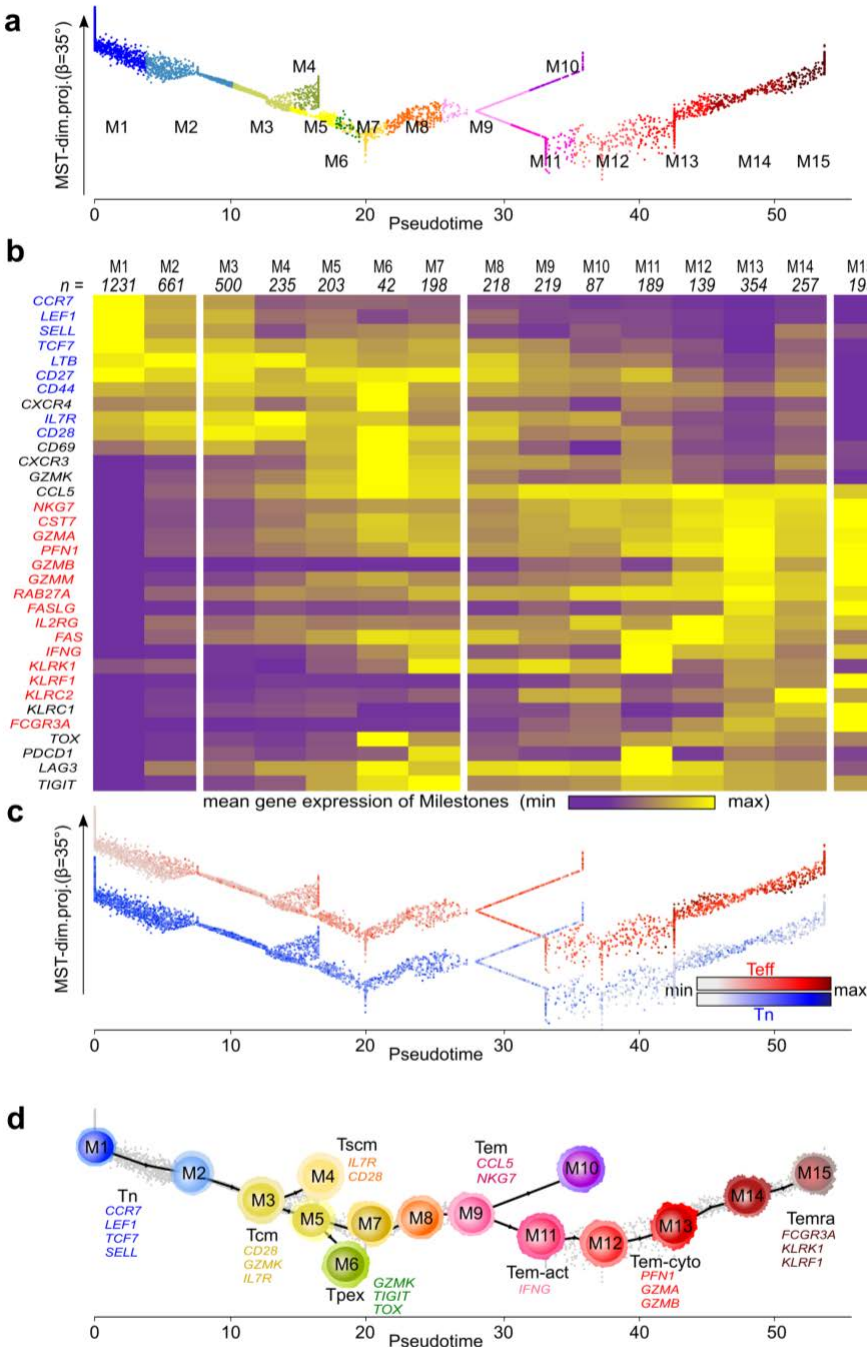


Figure 2: Pseudotemporal trajectory of differentiation of T CD8 lymphocyte controls.
a, Each extracted T CD8 cell is shown on the MST trajectory using as (x, y) coordinates its pseudotime, and a projection through angle β on pseudotime axis of MST dimension 1 and 2. Cell color key: pseudotime-ordered milestones. **b**, mean of gene expression level per milestone. Genes shown blue and red are included in the Tn and Teff signatures, respectively. **c**, Single cell scores for Tn and Teff signatures across the trajectory. **d**, Pseudotime-based milestones dendrogram overlaid to the trajectory shown in **a** featuring: cells (grey dots), milestones (Tn: blue, Tcm: yellow and green, Tem: pink and red), Temra (dark red), trajectory (dark line) and differentiation direction (arrows). Differentiation stages and selected marker genes are specified.

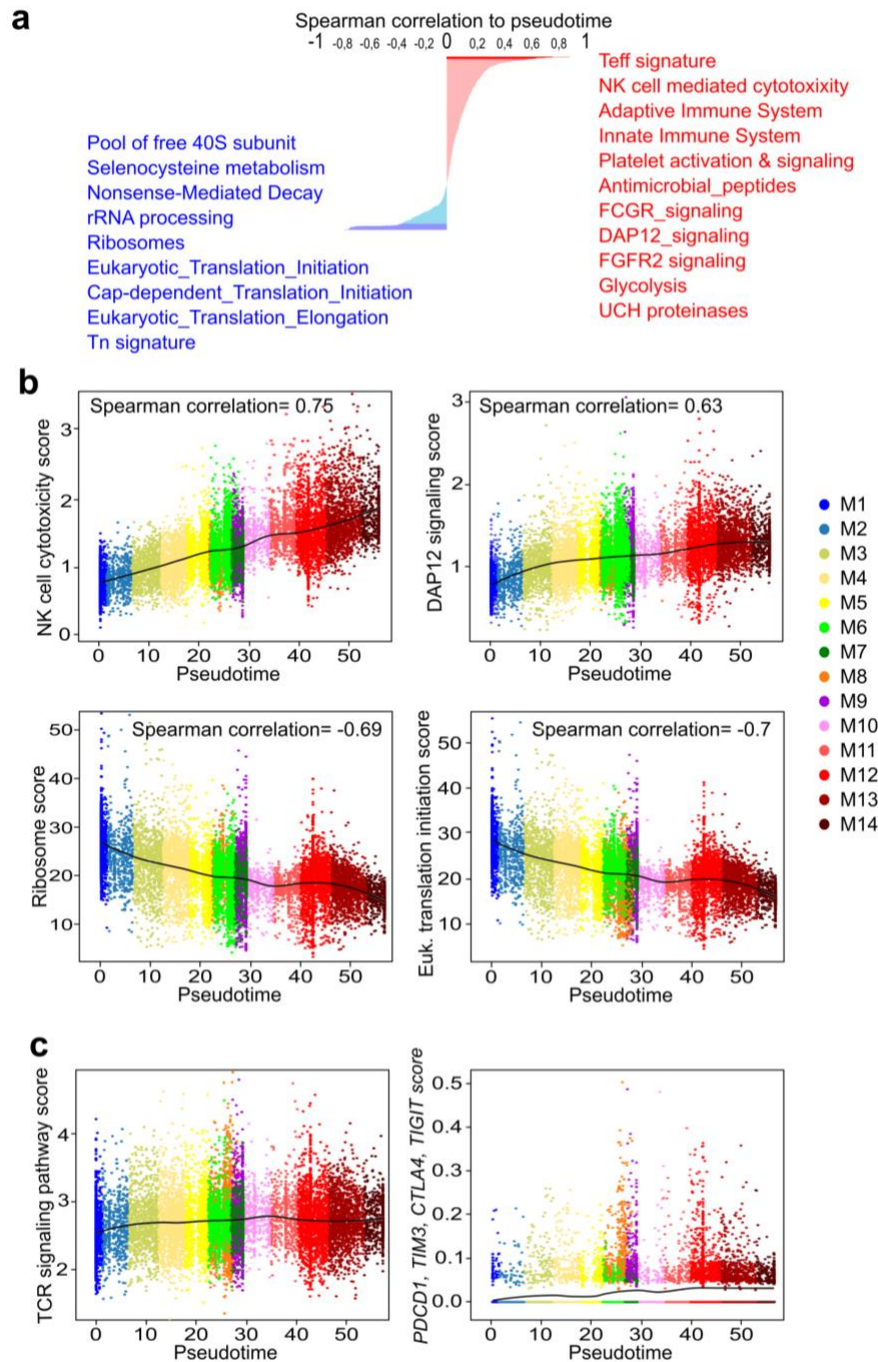


Figure 3: Multigene signatures correlated with pseudotime of $\gamma\delta$ T cell controls.
a, Composite of results from GO and Reactome databases indicating the most correlated (red) and anti-correlated (blue) signatures. **b**, Projection of representative signature scores versus pseudotime of the single $\gamma\delta$ T cell controls, colored by milestone as in Fig 2. Locally smoothing by LOESS with IC95% are overlaid (line and grey area). **c**, Same as **b** for signatures of TCR signaling and T cell exhaustion genes *PDCD1*, *TIM3*, *CTLA4*, *TIGIT* signatures that are not correlated to pseudotime but are increased in Tem cells from M8-M13. **b**, **c** same color key for milestones and locally smoothing by LOESS with IC95% (line and grey area).

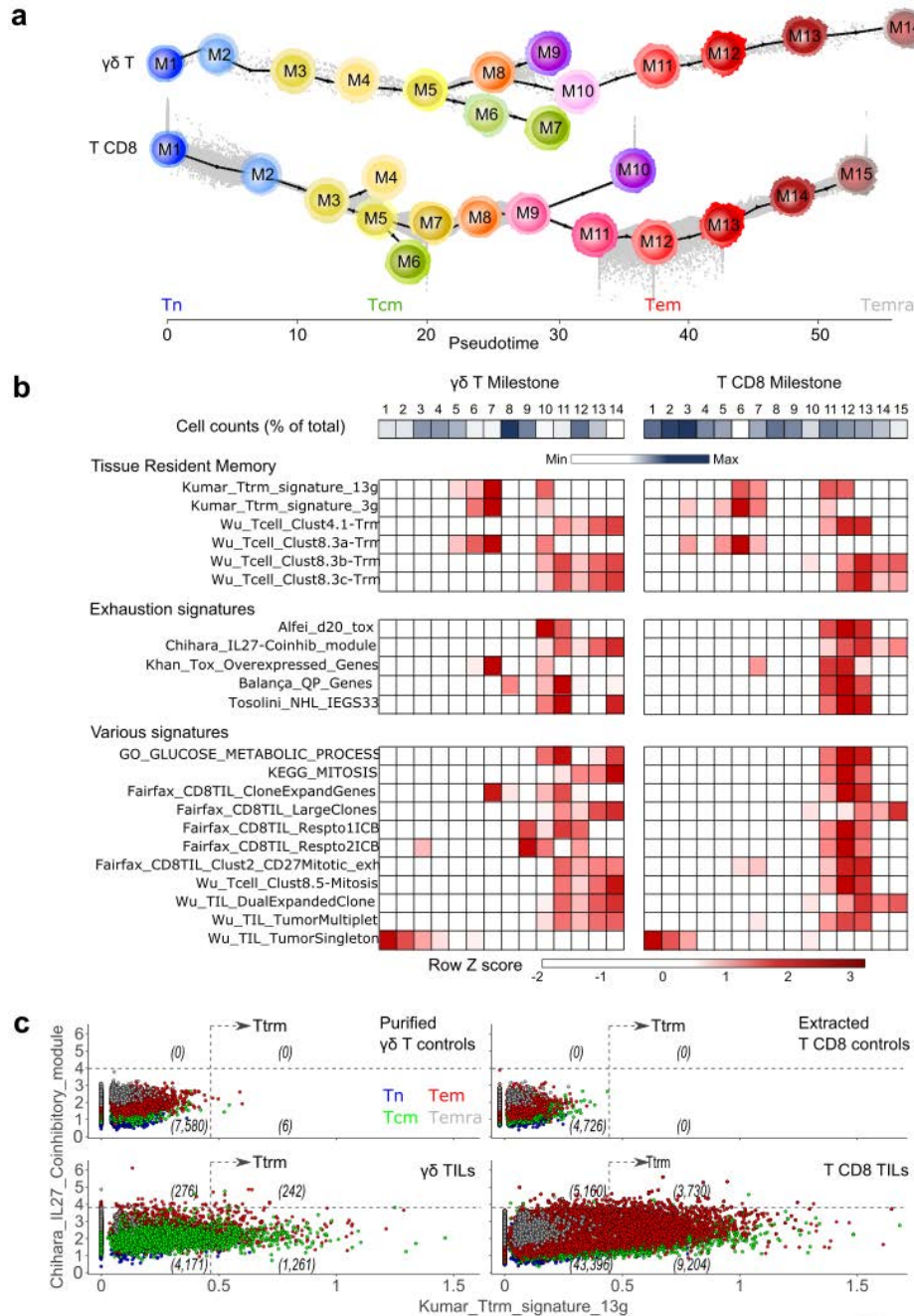


Figure 4

Figure 4: Trajectories of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs extracted from the cancer samples.

a, Dendrograms of milestones for $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs extracted from all cancer samples, showing milestone centroids (featured) overlaid on the pseudotime trajectory of all corresponding single cells (grey). **b**, Cell counts (% of total cells), and average of single cell scores per milestone. Milestone averages were normalized and shown as row Z-scores of the respective lineage. **c**, Tissue-resident memory (Kumar_Ttrm) and exhaustion (Chihara_IL27) signature scores of $\gamma\delta$ T and T CD8 single cells extracted from all control (top) and cancer (bottom) samples. Color key show milestones of $\gamma\delta$ T: M1, M2 for Tn (blue); M3-M7 for Tcm (green), M8-M13 for Tem (red), M14 for Temra (grey) and milestones of T CD8: M1, M2 for Tn; M3-M7 for Tcm, M8-M14 for Tem, M15 for Temra. Thresholds were set from the control cells (dotted line), quadrant cell counts are specified.

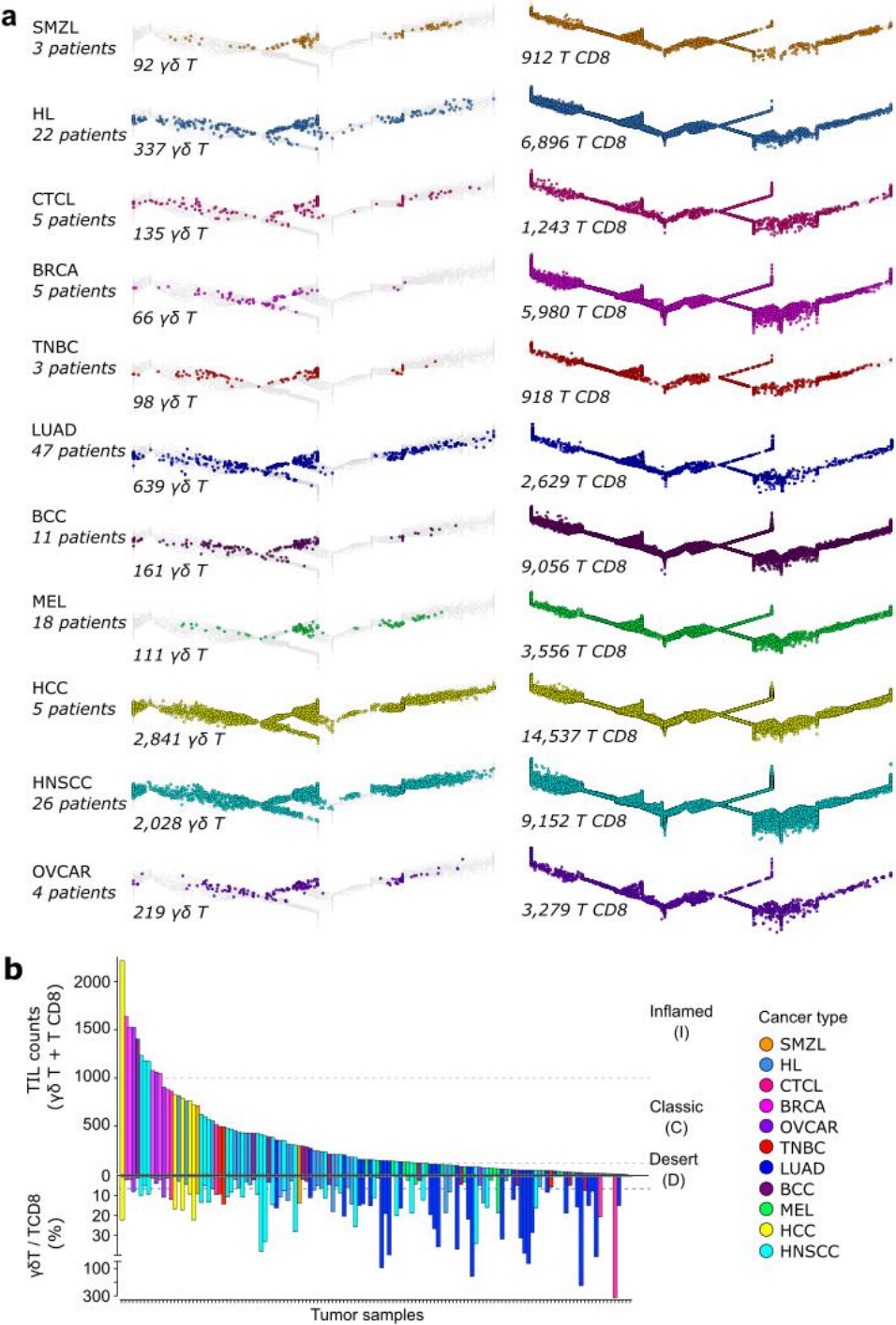


Figure 5: Trajectory mapping of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs per cancer type.
a, Overlay of all $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs extracted from each cancer type on the public trajectory of control blood cells of their respective lineage (grey). **b**, TIL cell counts and rates in each tumor shown by cancer type.

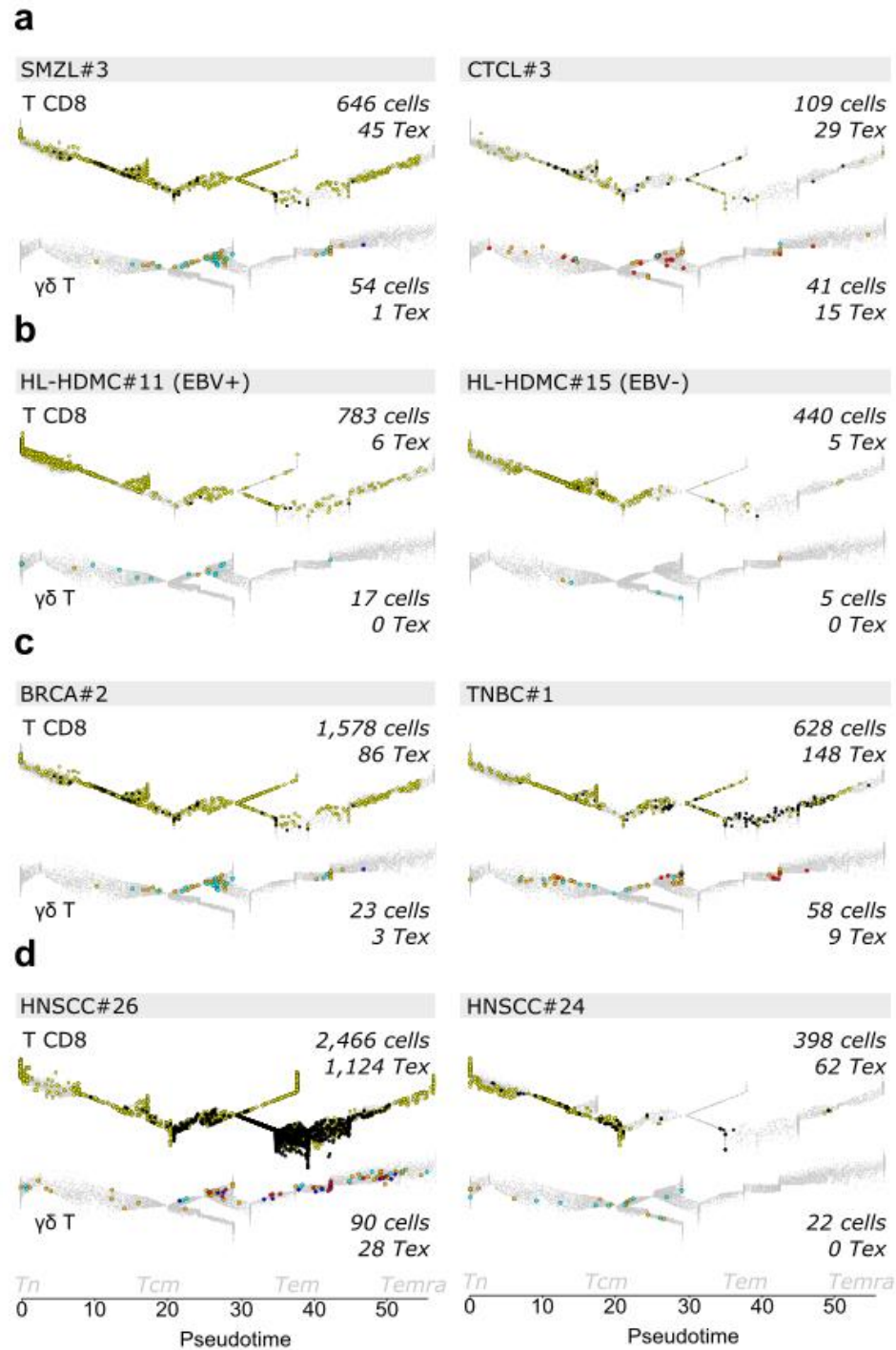


Figure 6: Trajectory mapping of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs from individual tumors.

All the $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs extracted from the specified sample are shown overlaid on their respective lineage trajectory (top: T CD8, bottom $\gamma\delta$ T, grey: control cells). Patients: **a**, SMZL#3 and CTCL#3; **b**, HL-HDMC#11 and #15; **c**, BRCA#2 and TNBC#1; **d**, HNSCC#26 and 23. Cells color: T CD8 (yellow), T CD8 Tex (black), TCRV γ 9 $\gamma\delta$ T (turquoise), TCRV γ non9 $\gamma\delta$ T (orange), TCRV γ 9 $\gamma\delta$ Tex (blue), TCRV γ non9 $\gamma\delta$ Tex (red).

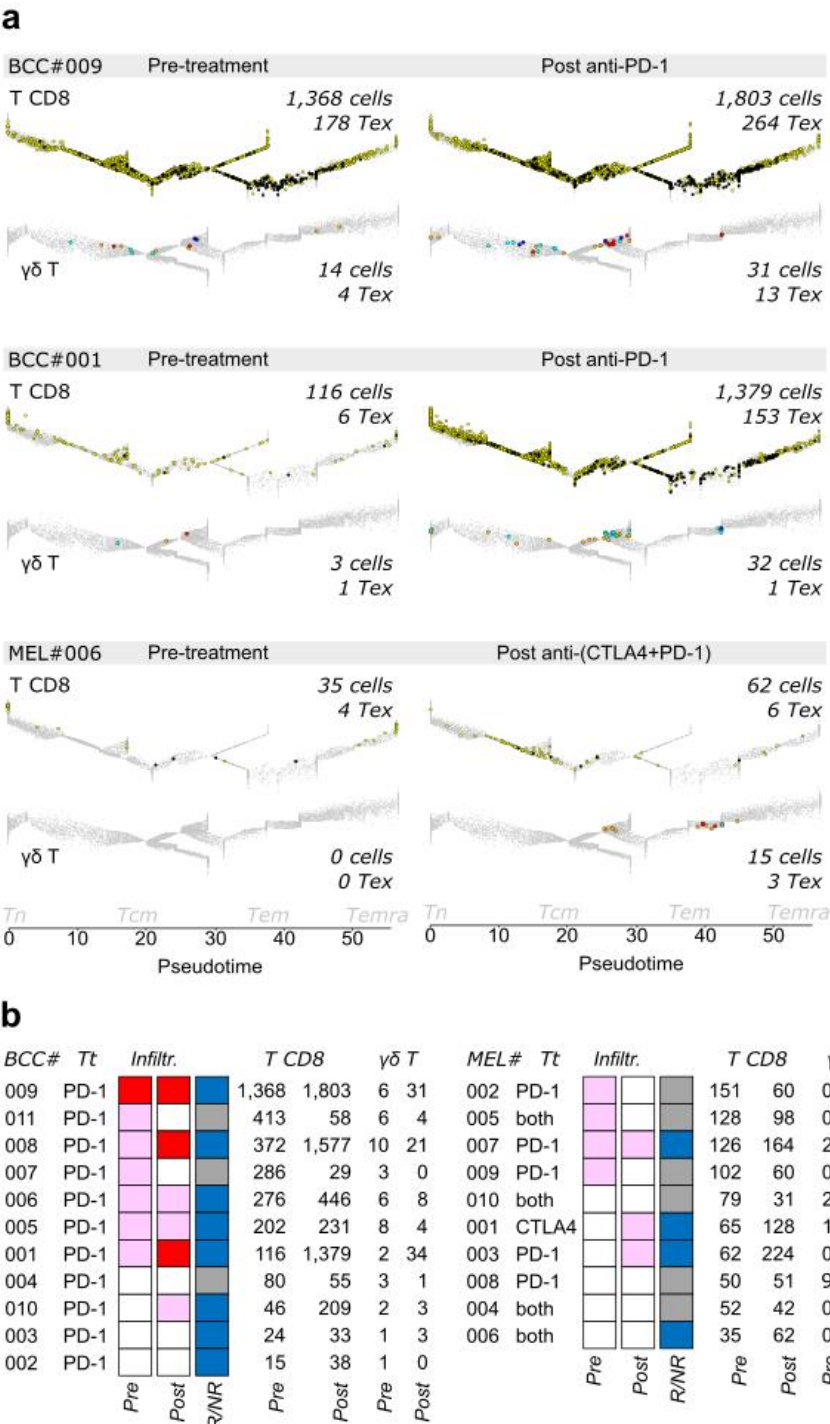


Figure 7: Trajectory mapping of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs from patients treated by ICB. The T CD8 and $\gamma\delta$ T TILs extracted from each specified tumor are overlaid on their respective pseudotimed trajectory (grey: control blood cells of the corresponding lineage; same color key as Fig.6). **a**, Representative examples pre-treatment of inflamed (BCC#009), classic (BCC#001), and desert (MEL#008) immune infiltrates. **b**, Summarized characteristics of infiltrates extracted from the BCC and MEL samples. R/NR: reactive and non-reactive immune infiltrates.

SUPPLEMENTAL INFORMATION: (link available until Feb. 21st, 2021 to download from:

<https://filesender.renater.fr/?s=download&token=44f5ac18-c548-4e4a-81ff-39cfa2fb3db>)

SUPPLEMENTAL TABLES (see attached files)

Table S1: Gene signatures used in the study. Excel file showing signatures per class (sheets), names (row 1), and gene symbols. Single gene signatures are directly from the specified original study.

Table S2: Pseudotime, milestones, and differentiation hallmarks of control $\gamma\delta$ T and T CD8 T lymphocytes extracted from healthy adults PBMC. Excel file specifying:

A: Source dataset & Author
B: Source tissue & Annotation
C: Cell Id tag
D: Cell lineage
E: TCR subtype
F: MST Milestone
G: MST Pseudotime
H: Differentiation stage
I: Tn signature score
J: Teff signature score
K: CITE-seq phenotype
L: Ttrm status (binarized)
M: Tex status (binarized)

Table S3: Pseudotime, milestones, and differentiation hallmarks of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs extracted from cancer patient biopsies. Excel file of 49,916 TILs out of total 65,000 extracted cells, specifying:

A: Source dataset & Author
B: Source tissue & Annotation
C: Cell Id tag
D: Cell lineage
E: TCR subtype
F: MST Milestone
G: MST Pseudotime
H: Differentiation stage
I: Tn signature score
J: Teff signature score
K: CITE-seq phenotype
L: Ttrm status (binarized)
M: Tex status (binarized)

Table S4: Summary of $\gamma\delta$ T and T CD8 TIL counts and infiltrate types per tumor from cancer patient biopsies. (Excel file)

Table S5: Summary of public datasets used in the study and cell counts extracted. (Excel file)

Table S6: Integrated (cell x gene) matrix of control blood and TILs-derived $\gamma\delta$ T lymphocytes, respectively annotated for pseudotime and differentiation hallmarks in [Tables S2, S3](#).

Table S7: Integrated (cell x gene) matrix of control blood and TILs-derived T CD8 lymphocytes, respectively annotated for pseudotime and differentiation hallmarks in [Tables S2, S3](#).

SUPPLEMENTAL FIGURES

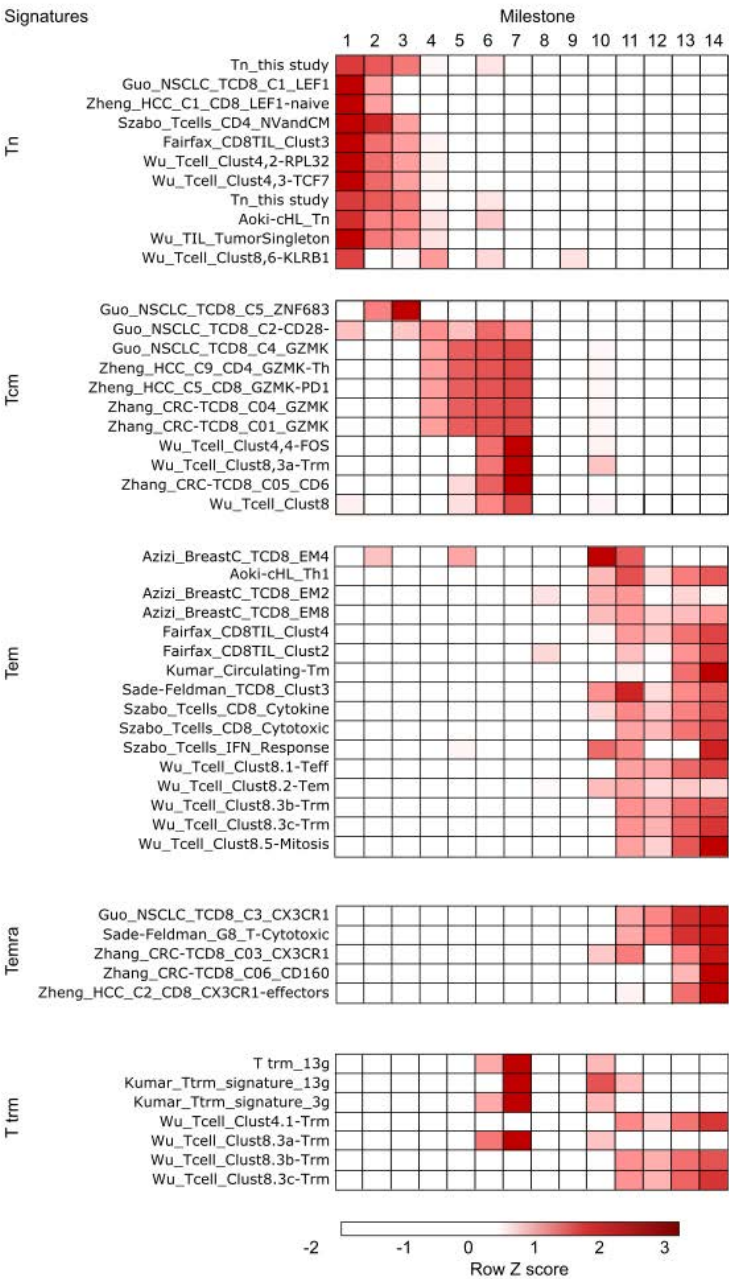


Figure S1, related to Figure 1. Mean single cell scores per milestones of control $\gamma\delta$ T lymphocytes for published gene signatures of T CD8 differentiation
The score of each of the (n= 6,259) extracted blood $\gamma\delta$ T lymphocyte for the specified gene signatures were computed with Single-Cell Signature Explorer, averaged per milestone, and shown as row Z-scores. These and the previous results allow to assign M1, M2 as Tn cells, M3-M7 as Tcm cells, M8-M13 as Tem cells, and M14 as Temra cells.

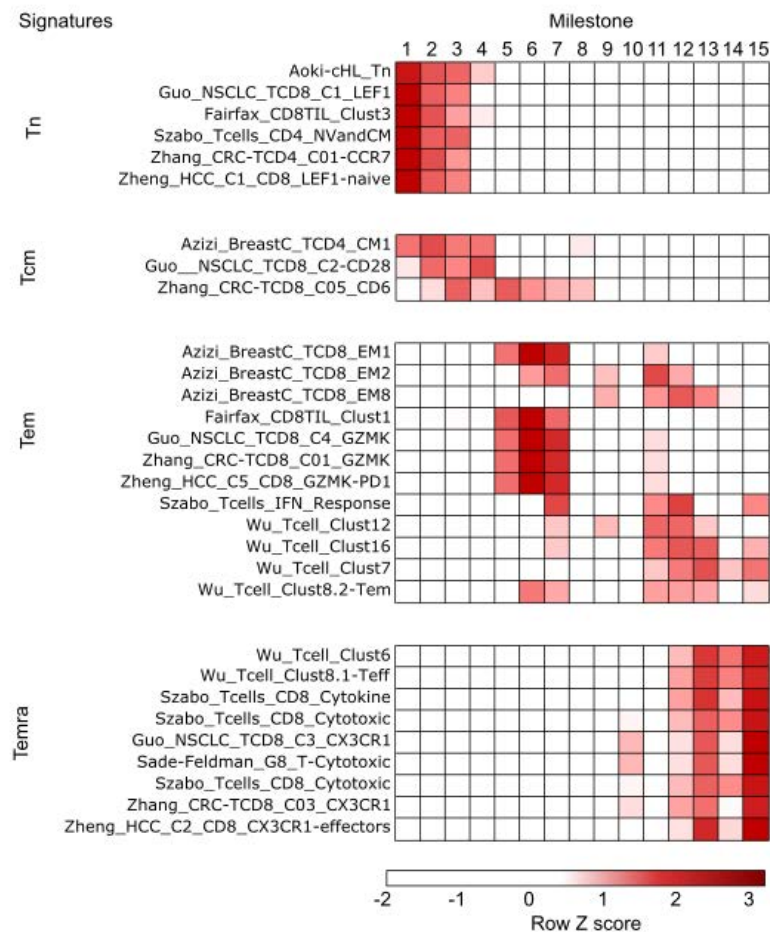


Figure S2, related to Figure 2. Mean single cell scores per milestones of control T CD8 lymphocytes for published gene signatures of T CD8 differentiation.

The score of each of the (n= 3,680) extracted blood T CD8 cell for the specified gene signatures were computed with Single-Cell Signature Explorer, averaged per milestone, normalized by row and shown as row Z-scores. These and the previous results allow to assign M1, M2 as Tn cells, M3-M7 as Tcm cells, M8-M14 as Tem cells, and M15 as Temra cells. The differentiation stage of tissue-resident cells (Ttrm) from M6, M7, and M10-14 are determined by their pseudotime.

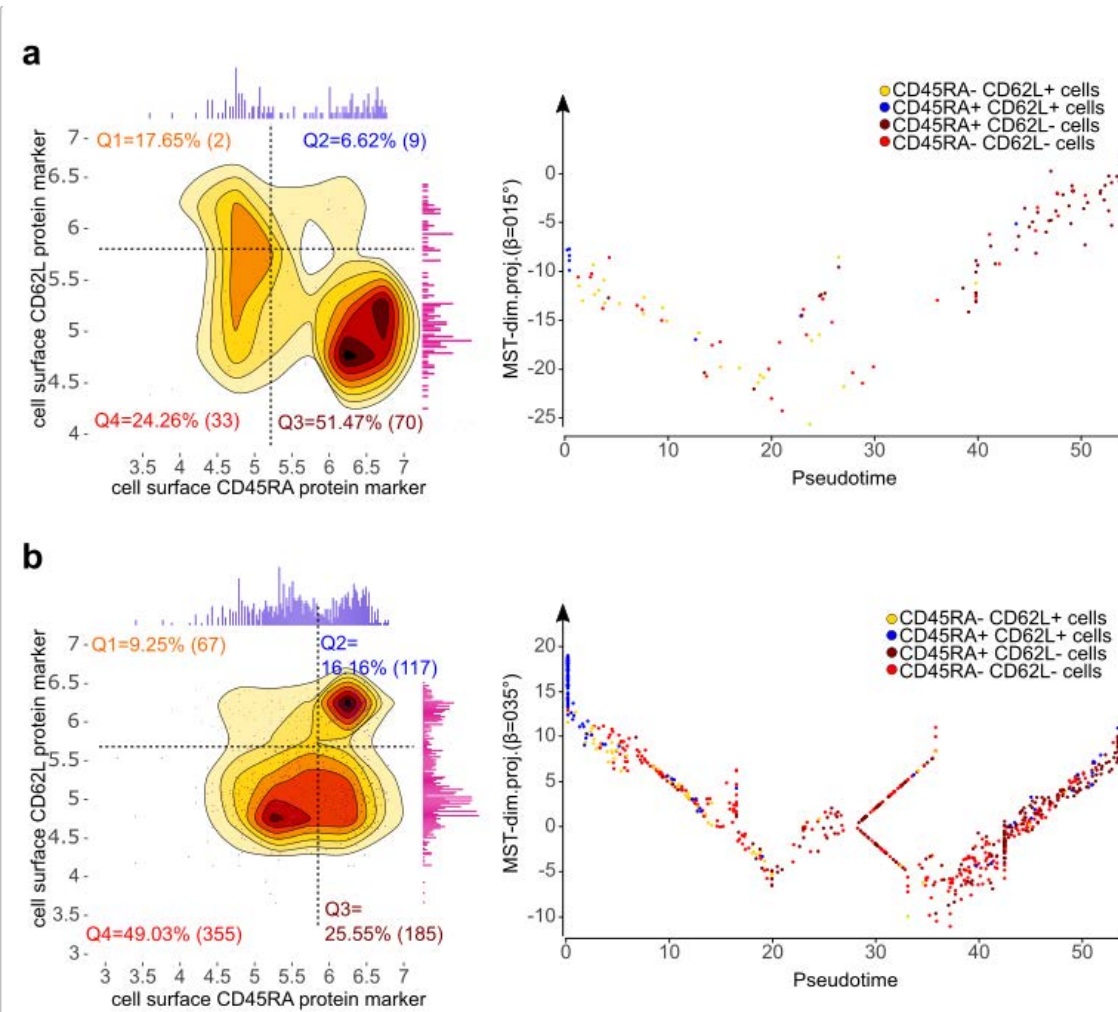


Figure S3, related to Figures 1-2: Correspondence of differentiation phenotypes and trajectory mapping of blood $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes extracted from a 3k PBMC CITEseq dataset (Pont et al., 2020).

a, $\gamma\delta$ T and **b**, T CD8 cells extracted from the PBMC CITEseq dataset by score and gate were analyzed for cell surface differentiation markers and for position on the trajectory map. Left: density scatterplots of CD45RA and CD62L cell surface immune phenotype showing (top and right projections) density histograms for each marker alone. Right: position on the pseudotimed trajectory of cells from the corresponding four quadrants.

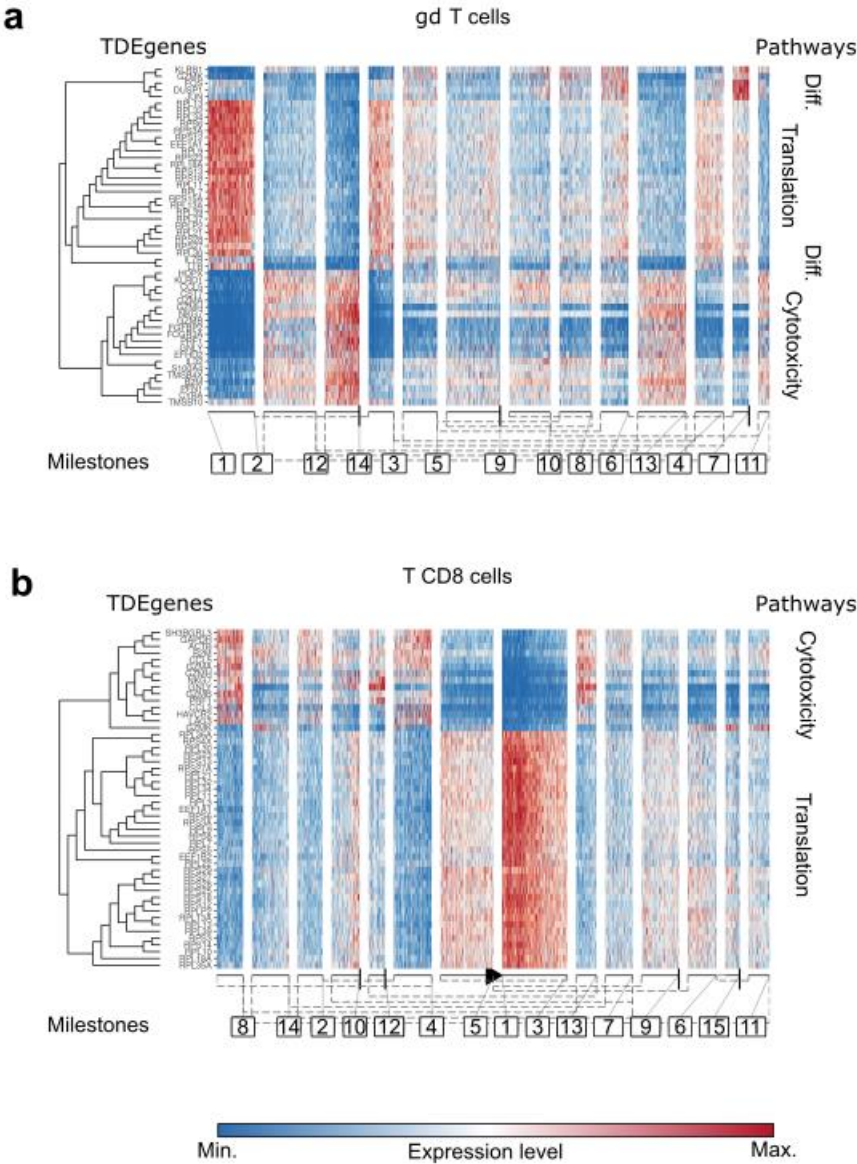


Figure S4, related to Figure 3. Trajectory-differentially expressed genes of control T lymphocytes.
Heatmaps for the top genes associated with the specified milestone transition of the lineage **a**, $\gamma\delta$ T and **b**, T CD8 cells.

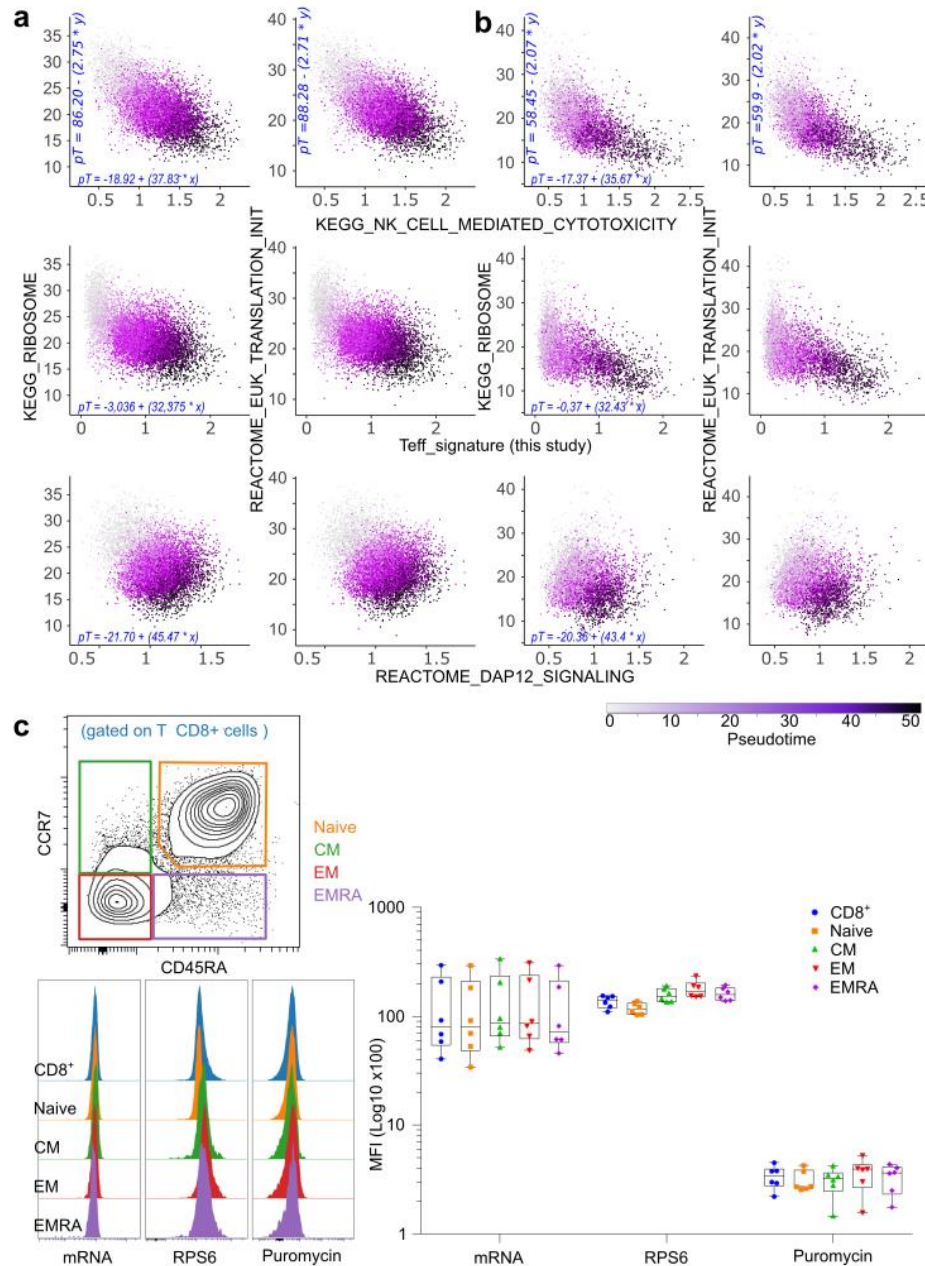


Figure S5, related to Figure 3: The inverse relationship of transcriptional programs for translation and cytotoxicity during $\gamma\delta$ T and T CD8 cell differentiation

a, Scatterplots of (n=7,744) control $\gamma\delta$ T lymphocytes scores for the specified signatures, showing cells colored by pseudotime (pT), and the linear regression of each signature to pT. **b**, Same as above for (n=4,726) control T CD8 lymphocytes. The regressions are strikingly similar in both lineages. **c**, Flow cytometry of resting T CD8 lymphocytes freshly isolated from healthy donor's PBMC stained for cell surface CCR7 and CD45RA defining Tn, Tcm, Tem, and Temra cells, and for intracellular mRNA, ribosomal protein RPS6, and translation marker Puromycin (Methods). Representative (left) and composite (right) of results from 6 donors, boxplots show range, means, and sd.

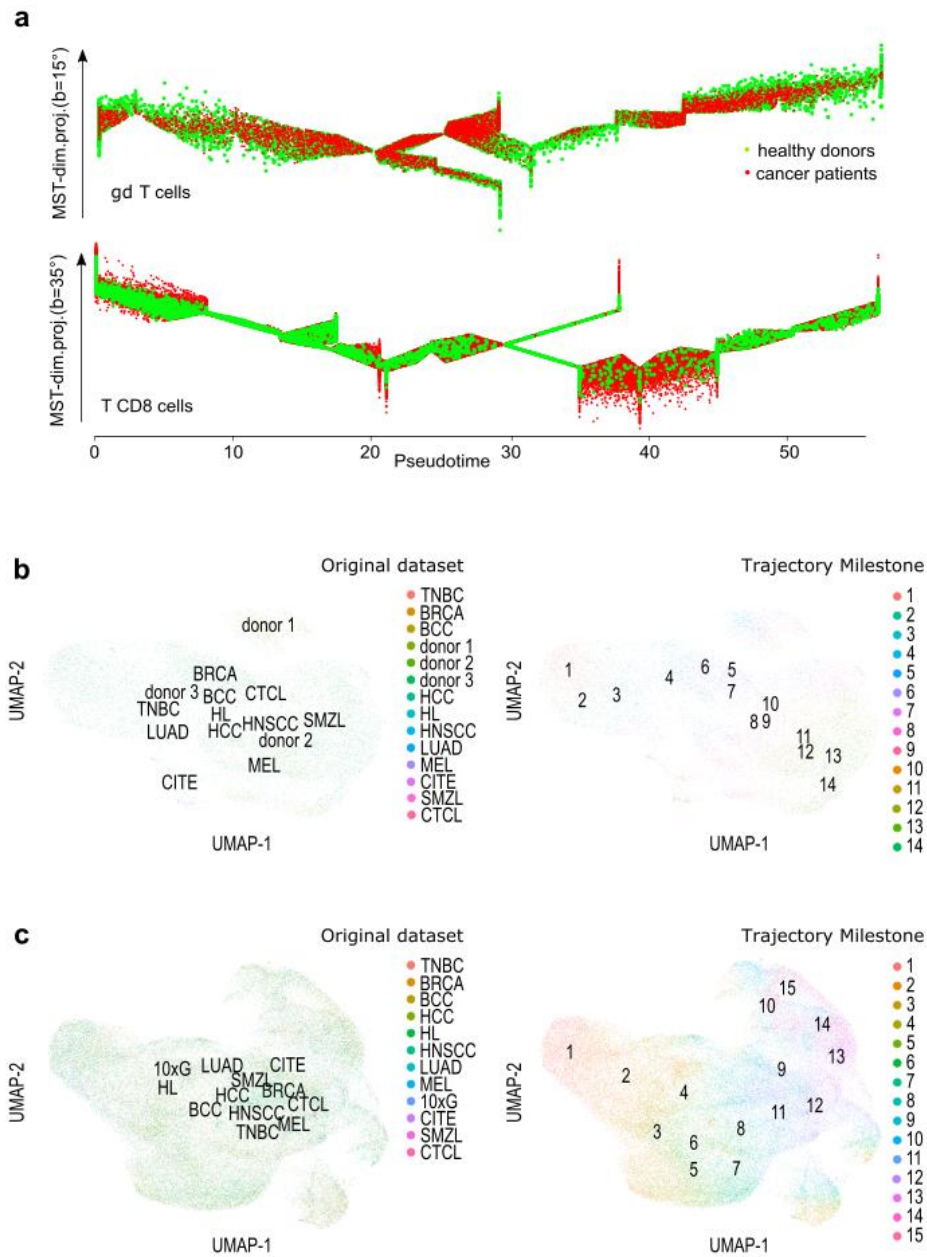


Figure S6, related to Figure 4: Consistency of all extracted $\gamma\delta$ T and T CD8 control cells and TILs.
a, Consistency of pseudotimed trajectories for cells extracted from the cancer (red) and from the control (green) samples. The (n=5,950) $\gamma\delta$ T (top) and (n=61,485) T CD8 TILs (bottom) extracted from the tumors (red) are overlaid on the public trajectory of the corresponding control lymphocytes (green) extracted from healthy donor's PBMC. **b**, Integration of both control and cancer $\gamma\delta$ T cell datasets shown in UMAP (*left*), and consistency of their trajectory milestones with UMAP embedding (*right*). **c**, Same as **b** for T CD8 cell.

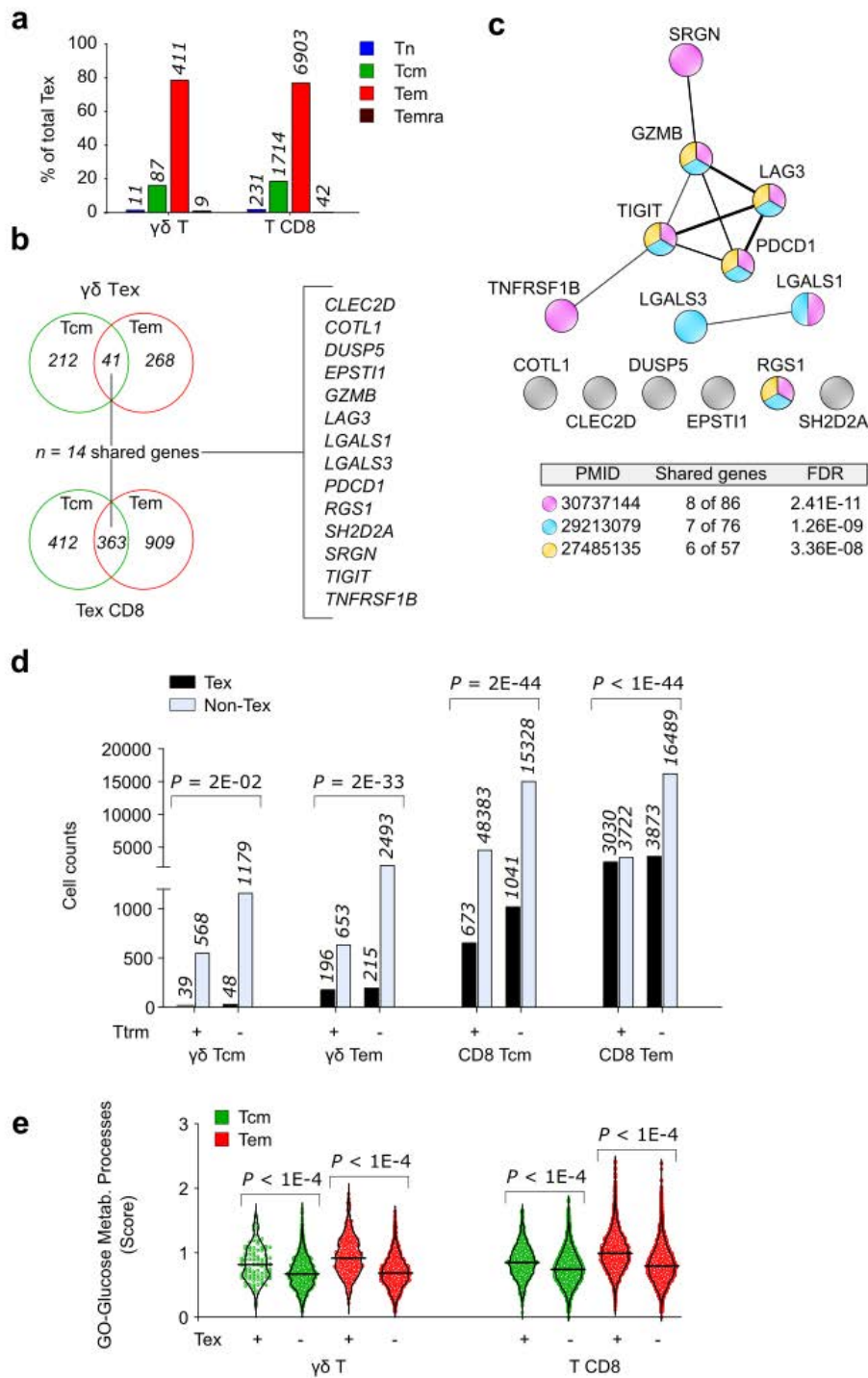


Figure S7, related to Figure 4: Hallmarks of Tex TILs

a, Proportion of the total Tex cells found per differentiation stage of the $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes, absolute counts are specified. **b**, Number of genes differentially up-regulated in Tex relative to non-Tex cells from the Tcm and Tem milestones of $\gamma\delta$ T lymphocytes and T CD8 linages, and the final 14 genes shared by all Tex Tcm and Tex Tem cells from both lineages. **c**, Protein-protein network encoded by the 14 shared genes, and their match with published gene sets. **d**, Exhaustion is significantly associated with tissue residency in both Tcm and Tem milestones from T $\gamma\delta$ and T CD8 TILs (χ^2 P values), absolute counts are specified above. **e**, Exhausted cells from Tcm and Tem stages of T $\gamma\delta$ and T CD8 TILs have significantly higher scores for the signature: 'GO-Glucose metabolic processes' than their non-exhausted counterparts. Violin plots and arithmetic means are shown (Mann-Whitney P values).

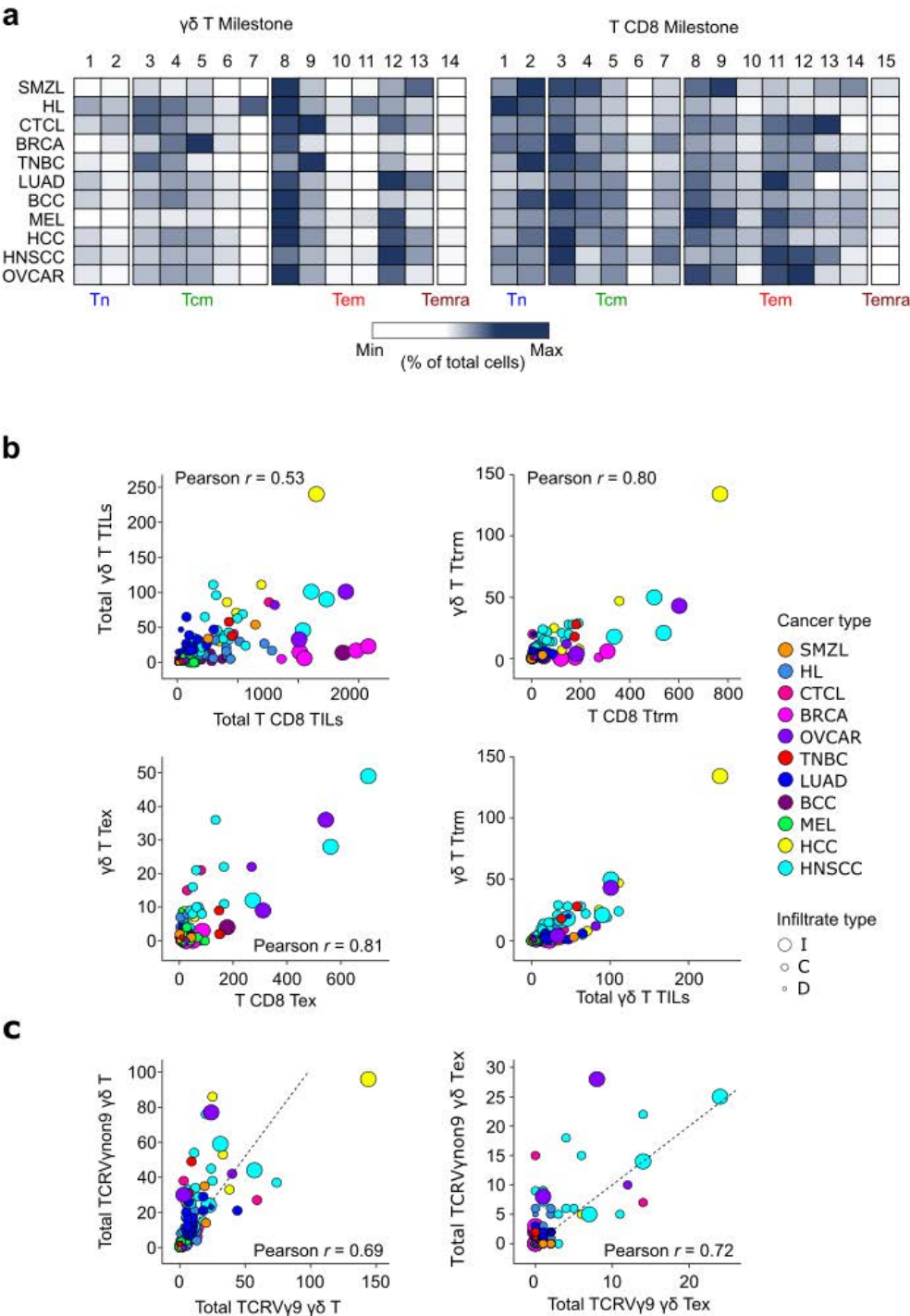


Figure S8, related to Figure 5: Landscape of cytolytic T cell infiltrates per cancer type.
a, Distribution of cell abundance per milestone and per cancer type. All samples from each cancer type were merged, counts per milestones were summed, and divided per total of all milestones. Resulting rates are shown by row Min-Max. **b**, **c**, Association of the specified cell counts per sample shown by size per infiltrate type, and color by cancer and type, as specified in legend. Diagonal: equal cell counts. Correlation statistics are specified.

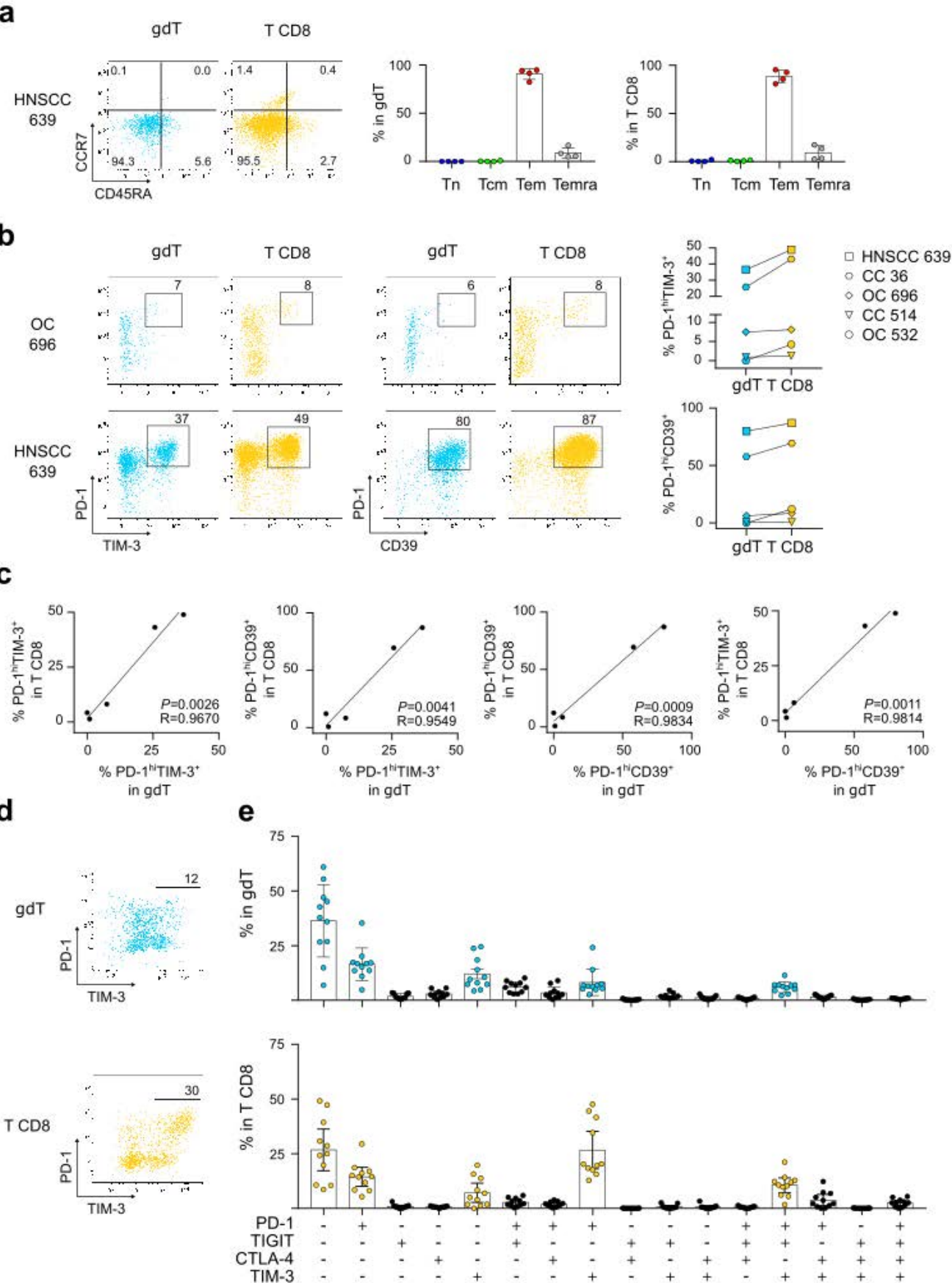


Figure S9, related to Figure 6: Coherent cell surface phenotypes of $\gamma\delta$ T and T CD8 TILs from cancer patients and mouse models

Cell sorted CD45⁺ cells from the specified tumor biopsies were stained *ex vivo* with mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD25, CD127, PD-1, TIM-3, CD39 and pan-TCR $\gamma\delta$, and then analyzed by flow cytometry. **a**, CCR7 versus CD45RA expression in $\gamma\delta$ T and T CD8 TIL from HNSCC patient. Rates of T_n, T_{cm}, T_{em}, and T_{emra} cells of $\gamma\delta$ T and T CD8 lineages are summarized for ovarian cancer (OC, n=1), cervical cancer (CC, n=2) and HNSCC (n=1) patients. The $\gamma\delta$ T lymphocytes were gated as CD3⁺CD8⁺CD4⁻ (n=1) or CD3⁺CD8⁺CD4⁻TCR $\gamma\delta$ ⁺ (n=3) cells. Results shown are from two independent experiments. **b**, PD-1 versus TIM-3 (left) and PD-1 versus CD39 (right) expression in $\gamma\delta$ T and T CD8 cells from one OC and one HNSCC patient. Rates of PD-1^{hi}TIM-3⁺ and PD-1^{hi}CD39⁺ cells in $\gamma\delta$ T, gated as CD3⁺CD8⁺CD4⁻ (n=2) or CD3⁺CD8⁺CD4⁻TCR $\gamma\delta$ ⁺ (n=3), and in T CD8 TIL are summarized for OC (n=2), CC (n=2), and HNSCC (n=1) patients. Results shown are from three independent experiments. **c**, Pearson correlation between the proportions of PD-1^{hi}TIM-3⁺ or PD-1^{hi}CD39⁺ cells in T CD8 and $\gamma\delta$ T TILs from the same patients as above. **d,e**, Single cell suspensions from HNSCC mouse tumors were stained (*ex vivo*) with mAbs specific for murine CD3, CD4, CD8, pan-TCR $\gamma\delta$, CD45.2, PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 and analyzed by flow cytometry. For analysis, $\gamma\delta$ T cells were gated as CD3⁺CD8⁺CD4⁻ cells (n=11). **d**, PD-1 versus TIM-3 expression in $\gamma\delta$ T (top) and T CD8 (bottom) TIL from one mouse (representative result). **e**, Proportions of subpopulations expressing the 16 possible combinations of PD-1, TIGIT, CTLA-4 and TIM-3 immune checkpoints in $\gamma\delta$ T (top) and T CD8 (bottom) TIL. The five higher median proportions of TIL subpopulations are represented for $\gamma\delta$ T (blue) and T CD8 TIL (yellow). Composite of results shown as mean and sd.

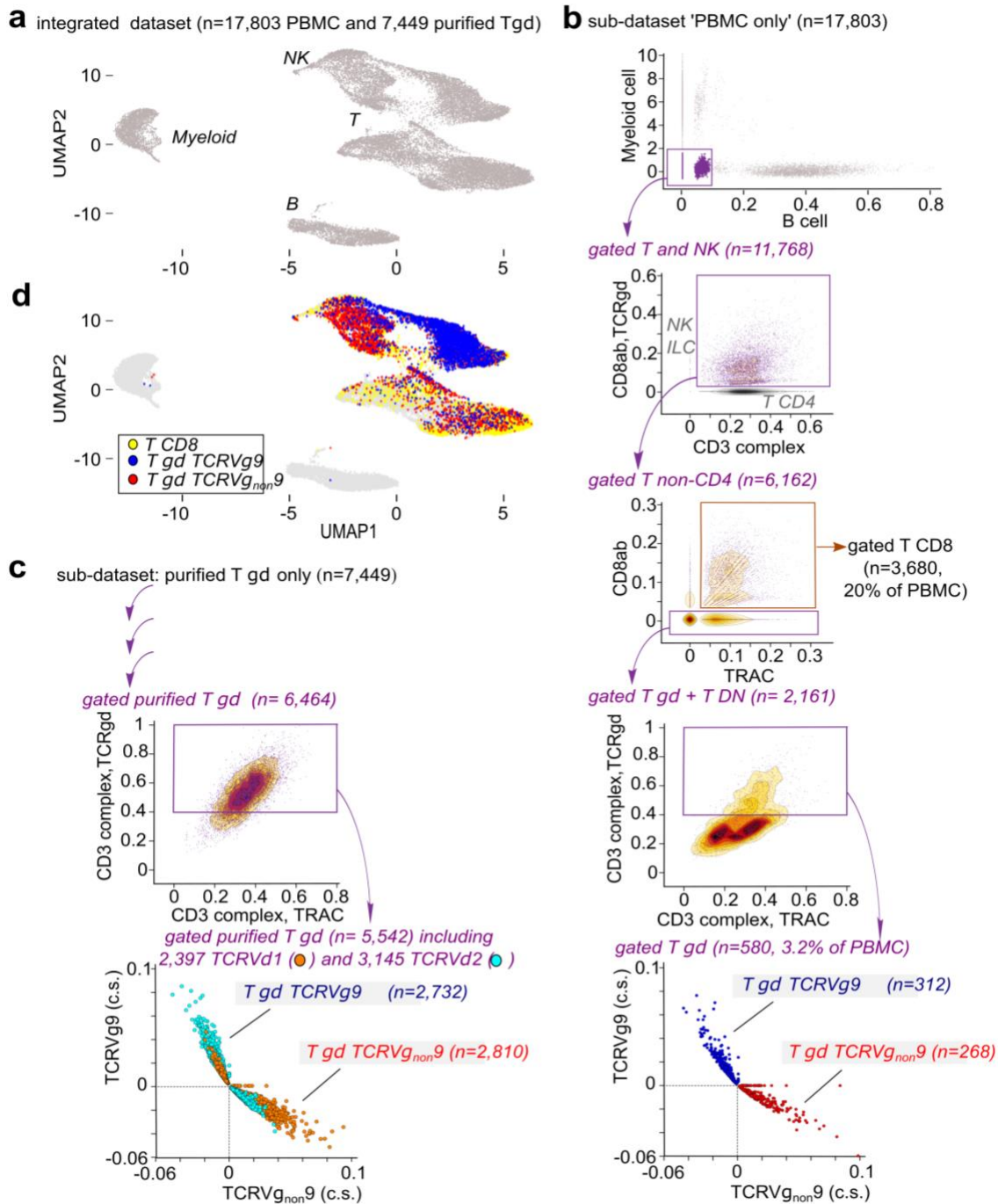
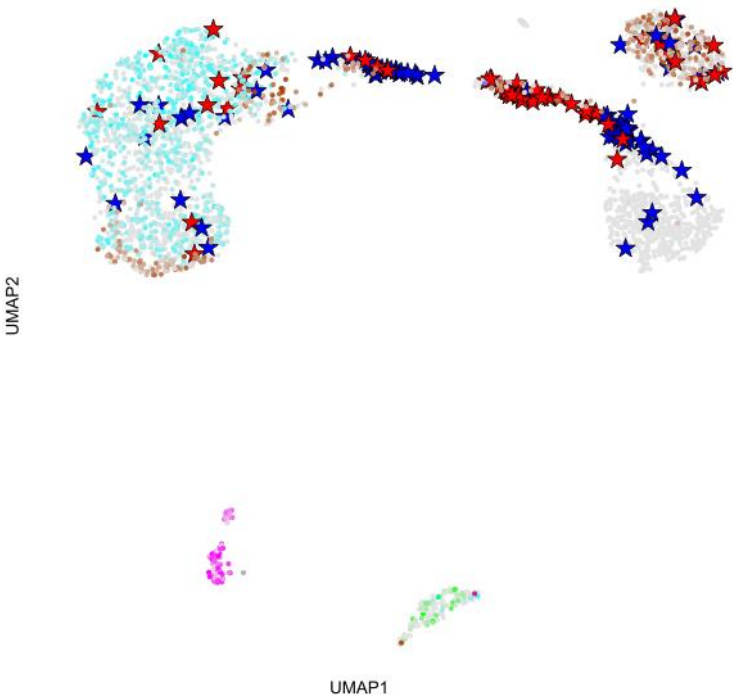


Figure S10: Score and Gate strategy (related to STAR Methods: digital extraction of cells)

a, Transcriptome-based UMAP of the reference dataset integrating PBMC and purified resting $\gamma\delta$ T lymphocytes. Cluster identified by the *CD14*, *CD19*, *CD3D*, *NCAM* marker genes. **b**, Score and gate sequence for digital extraction of the T CD8 and T $\gamma\delta$ single cells from the PBMC. c.s.: compensated scores (Methods). **c**, Results of the same sequence for the purified resting $\gamma\delta$ T lymphocytes. **d**, Same UMAP as in **a** displaying the extracted T cells.



Cell type	ADT staining	total cells in UMAP	assigned by score & gate:		
			T gd		T CD8
			TCRVg9 ★	TCRVg _{non} 9 ★	
B	● CD19	86	0	0	0
Monocyte	● CD14	111	0	0	0
T CD4	● CD3 CD4	1323	16	15	22
T CD8	● CD3 CD8	605	4	8	561
T DN	○ CD3 only	60	26	18	1
NK	○ no Ab	37	2	0	19
	○ dull/undefined	677	33	15	121
total cells		2899	81	56	725

Figure S11: Score and Gate Validation with $\gamma\delta$ T cells extracted from 3k PBMC CITE-seq dataset (related to Star methods: Score and Gate strategy). Transcriptome-based UMAP of the 3k PBMC CITEseq dataset highlighting cells stained with the specified ADT (inset). The $\gamma\delta$ T cells extracted by score and gate (red and blue stars) are embedded within the T CD4, T CD8, and NK cell clusters but not within the B and myeloid cells.

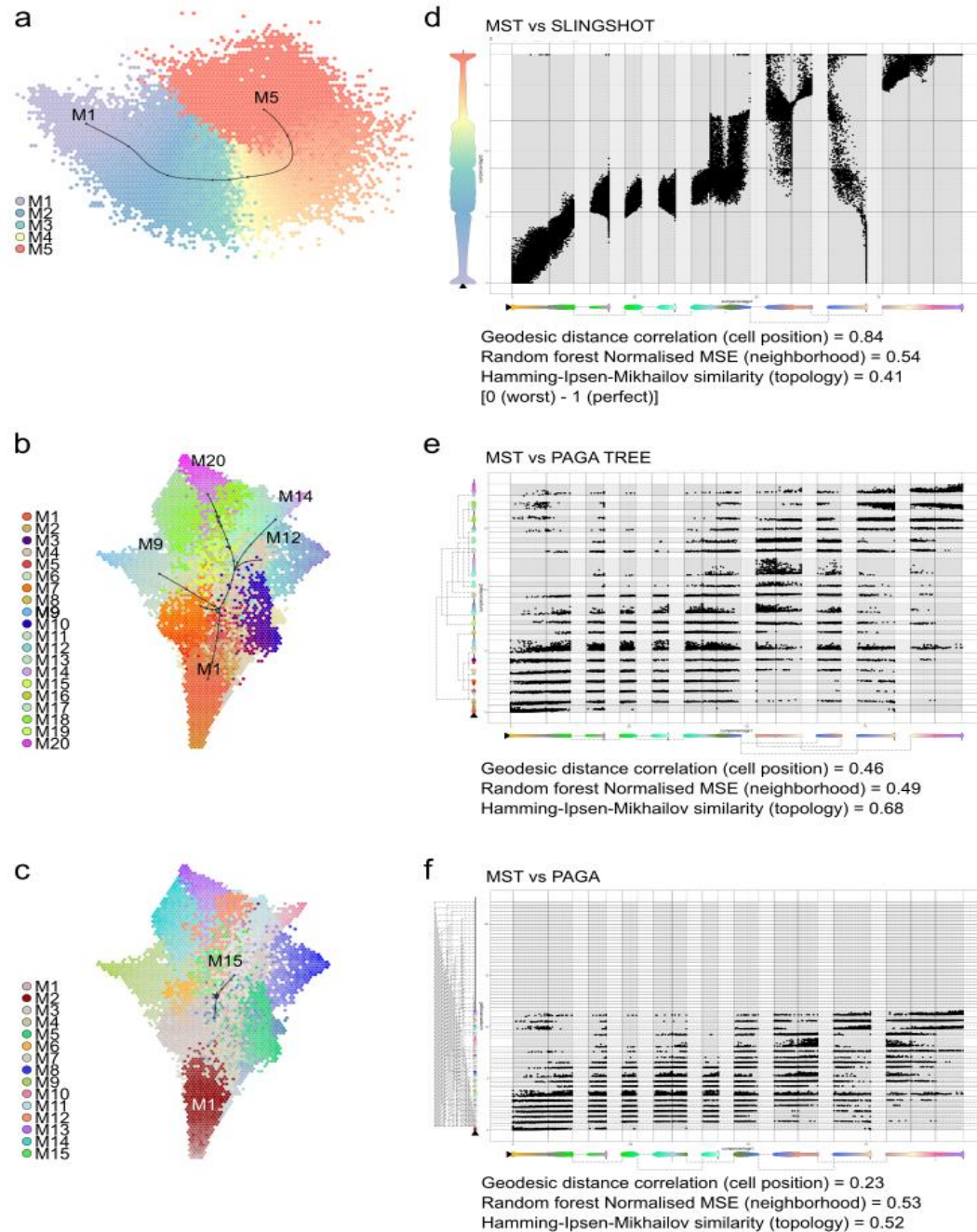


Figure S12: T CD8 cell differentiation trajectories computed by various TI algorithms (related to STAR Methods: Maturation trajectory inference)

Differentiation trajectory of the control blood T CD8 cells was computed by: **a**, Slingshot; **b**, PAGA-Tree; **c**, PAGA. The milestones of each trajectory are shown by the specified palette. Comparisons to MST by linearized trajectory plots of MST (x) versus **d**, Slingshot; **e**, PAGA-tree; **f**, PAGA (y). Metrics of comparison to MST are specified.

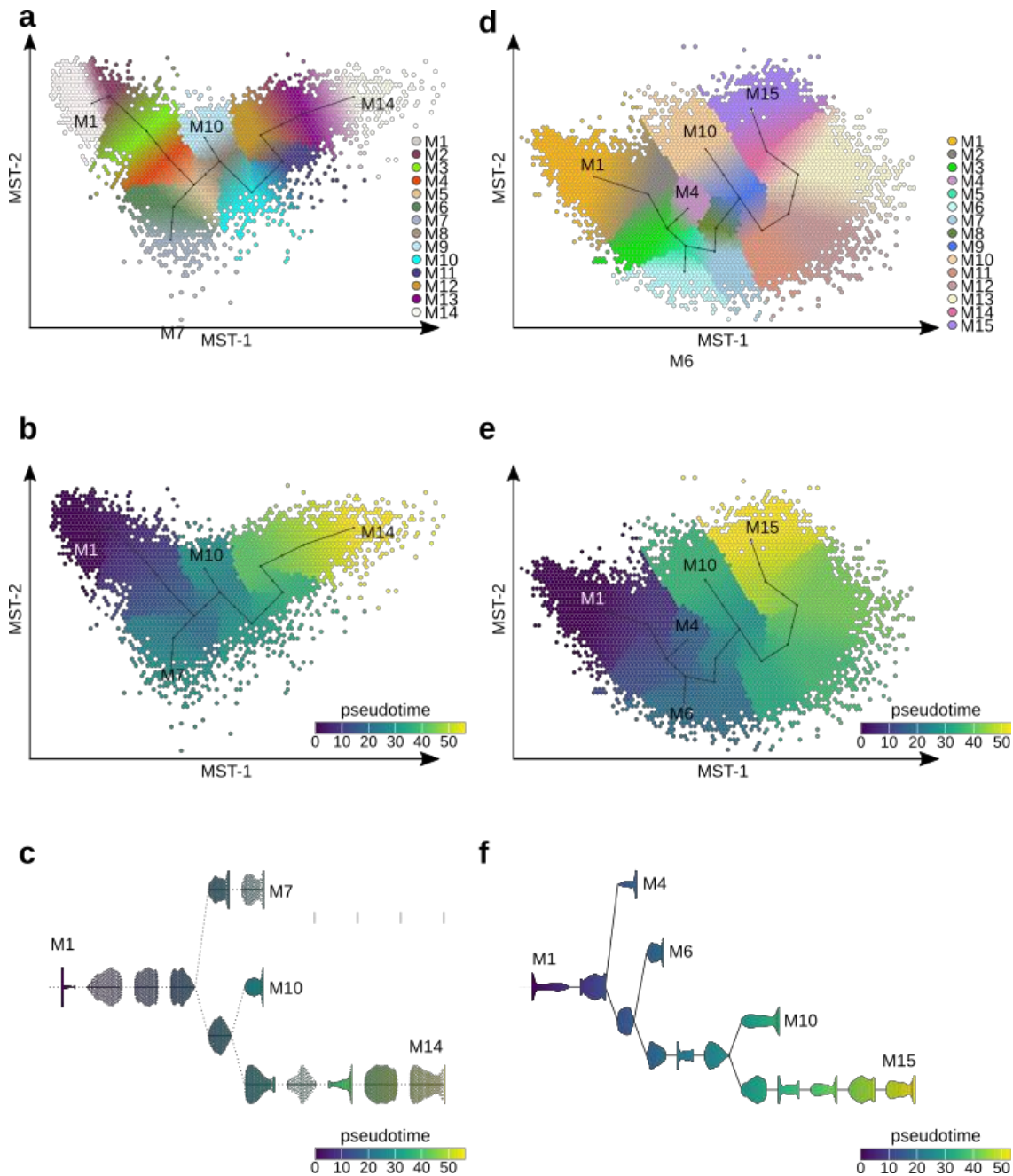


Figure S13: MST trajectory of the $\gamma\delta$ T and T CD8 cells extracted from PBMC (related to STAR Methods: Differentiation Trajectory Inference).

a: MST trajectory of $\gamma\delta$ T cell controls shown using (MST1, MST2) dimensions and milestones. **b:** same trajectory shown with MST pseudotime and milestones. **c:** dendrogram of $\gamma\delta$ T cell milestones colored by pseudotime as above. **d-f** same as **a-c** for MST trajectory of the T CD8 cell controls.

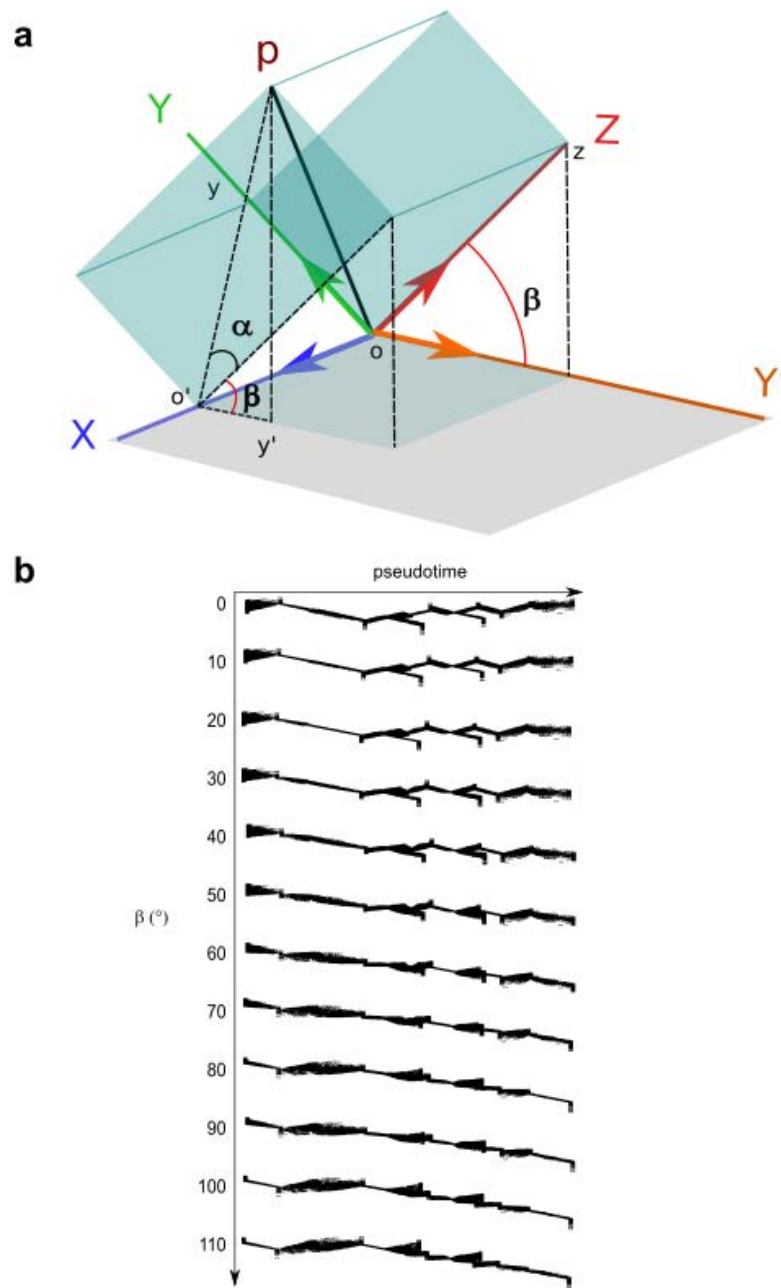


Figure S14: Projection of (MST1, MST2) dimensions on pseudotime (related to STAR Methods: Maturation trajectory inference).

a, Let any cell p coordinates be (x,y,z) in which pseudotime= x , MST1= y , MST2= z . The *dim_proj* method takes each cell's coordinates from a 3-dimension space (pseudotime, MST1, MST2 respectively as X, Y, Z) and projects them on 2-dimension space by keeping the pseudotime as one of these dimensions (XoY'). Between the 3 orthonormal dimensions (XYZ) and the projection plane (XoY'), there is a rotation angle (ZoY') named β . The pseudotime-projected coordinates of the cell p (x,y') are obtained as depicted (Methods). **b**: Effect of β (from 0 to 110°) on an example of trajectory.

922 **STAR METHODS**923 **KEY RESOURCES TABLE**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-human CD8a clone RPA-T8, BV421	BioLegend	cat # 301036; RRID: AB_10960142
anti-human CCR7 clone G043H7, PE-Cy7	Biolegend	cat # 353226; RRID: AB_11126145
anti-human CD45RA clone REA1047, PE-Vio615	Miltenyi Biotec	cat # 130-117-745; RRID: AB_2732977
anti-human S6 Ribosomal Protein clone 54D2,	Cell Signaling Technology	cat # 5317S; RRID: AB_10694920
anti-human CD3 clone UCH-T1, PE	BD Biosciences	cat # 555333; RRID: AB_395740
anti-human CD4 clone RPA-T4, BUV395	BD Biosciences	cat # 564724; RRID: AB_2738917
anti-human CD8 clone RPA-T8, V500	BD Biosciences	cat # 560774; RRID: AB_1937325
anti-human CD25 clone B1.49.9, APC	Beckman Coulter	cat # B09684; RRID: AB_2861133
anti-human CD127 clone A019D5, APC-Cy7	Biolegend	cat # 351348; RRID: AB_262957
anti-human PANTCRgd clone B1.49.9, FITC	Beckman Coulter	cat # B49175; RRID: AB_2861133
anti-human CD197 (CCR7), PerCP-Vio700	Miltenyi	cat # 130-108-288; RRID: AB_2655960
anti-human CD45RA clone L48, PE-Cy7	BD Biosciences	cat # 337186; RRID: AB_2828012
anti-human PD-1 clone EH12.1, BUV737	BD Biosciences	cat # 565299; RRID: AB_2739167
anti-human CD366 (TIM-3) clone 7D3, BV421	BD Biosciences	cat # 565562; RRID: AB_2744369
anti-human CD39 clone TU66, BV650	BD Biosciences	cat # 563681; RRID: AB_2738370
anti-mouse CD3 clone 145-2C11, BV786	BD Biosciences	cat # 564379; RRID: AB_2738780
anti-mouse CD4 clone GK1.5, BUV496	BD Biosciences	cat # 564667; RRID: AB_2722549
anti-mouse CD8 clone 53-6.7, BUV737	BD Biosciences	cat # 564297; RRID: AB_2722580
anti-mouse CD45.2 clone 104, FITC	BD Biosciences	cat # 553772; RRID: AB_395041
anti-mouse PD1 clone J43, BUV396	BD Biosciences	cat # 744549; RRID: AB_2742320
anti-mouse TIGIT clone GIGD7, PerCPeF710	eBiosciences	cat # 46-9501-82; RRID: AB_11150967
anti-mouse TIM3 clone RMT3-23, BV421	BD Biosciences	cat # 747626; RRID: AB_2744192
anti-mouse CTLA4 clone UC10-4B9, PeCy7	eBiosciences	cat # 25-1522-82; RRID: AB_2688105
anti-human CD19 clone HIB19, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 302263
anti-human TIGIT clone A15153G TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 372727
anti-human PDL1 clone 29E.2A3, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 329749
anti-human CD3 clone UCHT1 TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 300477
anti-human CD8a clone RPA-T8, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 301069
anti-human CD4 clone RPA-T4, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 300565
anti-human PD-1 clone EH12.2H7, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 329961
anti-human CD45R0 clone UCHL1, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 304257
anti-human CD14 clone M5E2, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 301857
anti-human CD56 clone QA17A16, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 392423
anti-human CD25 clone BC96, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 302647
anti-human CD45RA clone HI100, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 304161
anti-human IgG1 κ isotype clone MOPC-21, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400185
anti-human IgG2a κ isotype clone MOPC-173, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400291
anti-human IgG2b κ isotype clone MOPC-11, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400379
Biological samples		
human blood and splenic lymphoma samples	EFS, IUOTO	N/A (REC approval numbers: nDC-2009-989)

human HNSCC, OVCAR, and UTCAR tumor biopsy samples

IUCTO

N/A (REC approval numbers: (nDC-2016-2656 and DECIdE protocol NCT03958240))

Chemicals & Reagents

RPMI 1640 medium	Dutscher	cat # L0498-500
Fetal calf serum	ThermoFisher Scientific	cat # 10270-098
DMSO	Sigma-Aldrich	cat # CP-10
PBS	GIBCO	cat # 14200-067
Ficoll-Hypaque	GE Healthcare	cat # CMSMSL01-0U
HEPES	GIBCO	cat # 15630056
L-Glutamine	GIBCO	cat # 25030081
Penicillin-Streptomycin	GIBCO	cat # 15140122
Sodium Pyruvate	GIBCO	cat # 11360039
EDTA	Invitrogen	cat # 15575-038
Puromycin	Millipore	cat #MABE343; RRID: 1000-70
5'-Atto647-Oligo d(T)30	Integrated DNA Technologies	N/A
anti-human CD45 (TIL) MicroBeads	Miltenyi	cat # 130-118-781
RNase Inhibitor	Clontech	cat # 2313A
Triton X-100	Sigma-Aldrich	cat # T9284
dNTPs	ThermoFisher	cat # 10319879
ERCC RNA Spike-in mix	Ambion	cat # 4456740
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase	Clontech	cat # 639538
AMPure XP beads	Beckman Coulter	cat # A63881
96-well plates	Falcon	cat # 353077

Commercial Assays

Chromium Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3, 4 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000092
Chromium Single Cell B Chip Kit, 48 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000073
Chromium i7 Multiplex Kit, 96 rxns	10x Genomics	cat # PN-120262
Chromium Single Cell 3' Feature Barcode Library Kit, 16 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000079
High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit 1-6000bp	Agilent Technologies	cat # DNF-474-0500
Lib Quantification Kit Illumina universal	Roche Diagnostics	cat # 0796014000
Lib Quantification Standards 0-6	Roche Diagnostics	cat # 07960409001
NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles)	Illumina France	cat # 20024907
SPRIselect Reagent Kit	Beckman Coulter	cat # B23317
Phix Control v3 Référence FC-110-3001	Illumina France	cat # FC-110-3001
The Human T Lymphocytes Enrichment Set-DM	BD biosciences	cat # 557874
Transcription factor staining buffer set	eBioscience	cat # 00-5523
Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec	cat # 130-090-101
Mix-n-stain Antibody Labeling kit	Biotum	cat # 92272

Deposited Data

10x Chromium raw data	This paper	pending
Processed count matrices and metadata	This paper	attached to this file

Experimental Models: Cell lines

TC1 cells expressing the HPV16 E6 and E7 proteins	T.C. Wu (Johns Hopkins University, Baltimore, USA)	N/A
---	--	-----

Experimental Models: Organisms and Strains

C57BL/6 mice	Janvier Labs	C57BL/6Rj
--------------	--------------	-----------

Softwares, Algorithms and versions

Single-cell Multilayer Viewer	This paper	https://github.com/MarionPerrier/scMLV
Single-Cell Signature Scorer	(Pont et al., 2019)	https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/single-cell-signature-explorer
Single-Cell Virtual Cytometer	(Pont et al., 2020)	https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/single-cell-virtual-cytometer
Seurat v3.2.2	(Satija et al, 2015)	https://satijalab.org/seurat/
dynamo v0.1.2	Github via devtools	https://dynverse.org/
tidyverse v1.3.0	Github via devtools	https://dynverse.org/
Prism 8 v8.4.1	GraphPad Software	N/A
Flowlogic v7	Miltenyi Biotec	cat # 150-000-382
CellRanger	10x Genomics	N/A
R	R Development Core Team	https://www.r-project.org/
Cytobank	Beckman Coulter	http://www.cytobank.org

Others

10x library preparation protocol	10x Genomics	https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/library-prep
----------------------------------	--------------	---

Resource availability

Lead Contact Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled upon reasonable requests by the Lead Contact, Jean-Jacques Fournie (jean-jacques.fournie@inserm.fr).

Materials Availability This study did not generate new unique reagents.

Data Availability The raw data produced in this study are available at Gene Expression Omnibus (GEO) with a pending GSE accession number. Published scRNAseq datasets used in this study are available at GEO with the accession numbers: GSE110686, GSE114724, GSE120575, GSE123813, GSE128531, GSE139324, GSE140228; at the European Genome-phenome Archive (EGA) with the accession number: EGAS00001004085; and at the Array Express Archive (AE) with the accession number: E-MTAB-6149. The integrated (cell, UMI) matrices of $\gamma\delta$ T and T CD8 depicted in [Tables S2, S3](#) are available in [Tables S6, S7](#).

Code Availability Single-cell Multilayer Viewer (scMLV) developed for this study is available on GitHub repository: <https://github.com/MarionPerrier/scMLV>. Single-Cell Signature Scorer and Single-Cell Virtual Cytometer are available at: <https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products>. Seurat v3.2.2 is available from the Comprehensive R Archive Network (CRAN) and further details in the installation could be found on <https://satijalab.org/seurat/>. The collection of R packages (dynamo v0.1.2 and tidyverse v1.3.0) are available from Github via devtools, further details in the installation could be found on <https://dynverse.org/>.

Experimental model and subject details

Clinical/Patient sample collection The SMZL samples were collected at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole (IUCT-O) and processed at the CRB Cancer from Hôpitaux de Toulouse, following the standard ethical procedures (Declaration of Helsinki), after obtaining written informed consent from all patients and upon approval by the Institutional Review Board (nDC-2009-989). The carcinoma samples were collected from patients with head and neck squamous cell carcinoma, ovarian cancer and cervical cancer at the time of surgery at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole (IUCT-O) in accordance to the Declaration of Helsinki, upon approval by the Institutional Review Board (nDC-2016-2656 and DECIDE protocol, NCT03958240) and signed informed consent.

Mouse models Female C57BL/6 mice, seven weeks old, were purchased from Janvier Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France) and then maintained in pathogen-free facilities for experiments and for the specified analyses. Experimental protocols were approved by regional Ethic Committee of Toulouse Biological Research Federation (ref C2EA-01, FRBT) and by the French Ministry for Higher Education and Research. The European directive 2010/63/EU was followed for guidelines on animal welfare.

Method details

Cells and flow cytometry Healthy donors PBMC were obtained after Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) density centrifugation, and cultured in RPMI 1640 medium (Dutscher) supplemented with 10% fetal bovine serum (ThermoFisher Scientific). Human tumor biopsy specimens were weighed, washed with PBS and mechanically disrupted. These preparations were centrifuged on a Ficoll gradient and frozen. When specified in text, T cells were isolated by negative selection using the Human T Lymphocytes Enrichment Set-DM (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. TC1 cells expressing the HPV 16 E6 and E7 proteins were developed in the laboratory of T.C. Wu (Johns Hopkins University). Resting PBMC control were processed for immunostaining with the specified antibodies or ADT (Biolegend) for 20 min at room temperature. For intracellular stainings, cells were fixed and permeabilised using the transcription factor staining buffer set (eBioscience) before staining with the proper antibodies or reagent. Used antibodies are listed in the Key Resource Table. Flow cytometry acquisitions were performed on a BD LSR II cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with Cytobank (<http://www.cytobank.org>).

Single cell RNA sequencing The Chromium Controller Single-Cell Instrument and Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit (V3) were used to prepare individually barcoded single-cell RNA-Seq libraries, following manufacturer's instruction (10x Genomics). Briefly, cells were thawed and viability was improved by using Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec). Then, cells were washed twice with calcium and magnesium free phosphate buffered saline containing 0.04% bovine serum albumin, and re-suspended at a concentration comprised between 700-1200 cells/ μ L (viability>90%) in the same buffer. For the experiment, 10 000 cells of each sample were loaded to obtain a yield comprised between 2000 and 7000 sequenced cells. Reverse transcription was performed on the C1000 Touch Thermal Cycler, and cDNA were amplified for 12 cycles. cDNA quality control and dosage were performed on Fragment Analyzer, and then by PCR. Double sided size selection of PCR products was performed with SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter). The sequencing-ready library was cleaned up with SPRIselect beads (Beckman Coulter) and the sequencing was performed on a HiSeq 3000 instrument (Illumina) with a sequencing depth of at least 50,000 reads per cell.

Quantification and statistical analysis

scRNA-seq data pre-processing and QC The sequencing output bcl2 files were converted to FASTQ format by using [cellranger-mkfastq](#)TM algorithm (10x Genomics), and [cellranger-count](#) was applied to align to the GRCh38 reference transcriptome and build the (cell, UMI) expression matrix for each sample. Preprocessing, normalization of UMI, and QC were assessed using the R package [Seurat](#) ([Butler et al., 2018](#); [Stuart et al., 2019](#)). First, genes that correspond to human leukocyte antigens (HLA) and genes located in chromosome X and Y were removed, and the quality of cells was then determined by the number of detected genes per cell, and the proportion of mitochondrial genes. Additional datasets downloaded from 10x Genomics website, Gene Expression Omnibus (GEO), European Genome-phenome Archive (EGA), and ArrayExpress followed the same preprocessing and QC analyses.

Gene annotations All gene symbols and protein annotations were from public databases (Uniprot, Genecards, and The Human Protein Atlas for humans) and transcription factors genes were defined as such from the GO annotations.

Integration of PBMC scRNASeq datasets Here, 7 different scRNAseq datasets were assembled to digitally extract control $\gamma\delta$ T lymphocytes from PBMC of several healthy individuals. This comprised (n=8,202) pure $\gamma\delta$ T lymphocytes cell-sorted by cell surface TCRV δ 1 or TCRV δ 2 from the PBMC of n=3 healthy donors ([Pizzolato et al., 2019](#)) and (n=25,736) PBMC from 4 other healthy donors (4k +8k from 10XGenomics-3'platform V2, and 10k +1k from 10XGenomics-3'platform V3 downloaded from 10xGenomics resource). After pre-processing and QC discarding cell doublets and dying cells, the 7 datasets were integrated using Seurat 3.0 ([Stuart et al., 2019](#)). Briefly, the datasets were normalized together and variable features from each dataset were identified by [FinVariable-Data](#) before identification

of anchors correspondences across all the datasets. The final integrated so-called ‘control’ dataset expression matrix contained 26,313 features across $n=25,252$ control cells ($n=17,803$ PBMC plus $n=7,449$ purified $\gamma\delta$ T lymphocytes). Principal components analysis (PCA) was performed on this integrated dataset and used to calculate uniform manifold approximation and projection (UMAP), as well as t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) coordinates. When visualized in UMAP space (McInnes et al., 2018), its main cell types were annotated by expression of the *CD14*, *CD19*, *CD3D*, and *NCAM* marker genes (Figure S10 a).

Single cell signatures and scores Integrated and normalized scRNAseq datasets were then scored for the multigene signatures specified in text (Table S1) which were downloaded from the MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>) unless specified otherwise. Each single cell score for each geneset was computed as described (Pont et al., 2019). Briefly, Single-Cell Signature Scorer computes the score of cell C_j for gene set GS_x as the sum of all UMI for all the GS_x genes expressed by C_j divided by the sum of all UMI expressed by C_j :

$$\text{Score of cell } C_j \text{ for geneset } GS_x = (\sum(UMI)_{GS_x}) / (\sum(UMI)_{C_j}) \quad (1)$$

For further visualization, all cell signatures scores are merged with each cell's UMAP coordinates using Single-Cell Signature Merger (Pont et al., 2019).

Score and Gate of $\gamma\delta$ T and T CD8 cells from PBMC Based on using single cell signature scores to identify cells, this procedure allows the selective and exhaustive digital isolation from any scRNAseq dataset of any subset of cells specified by characteristic single cell scores. The $\gamma\delta$ T cell detection which previously relied on a single gene signature (Pizzolato et al., 2019), was improved here by implementing a sequence of positive and negative cell selections from multiple gene signatures, called ‘Score and Gate’. The above $n=25,252$ single cells were scored for the specified gene signatures (Table S1) using Single-Cell Signature Explorer (Pont et al., 2019) and scores were sequentially visualized on scatterplots by Single-Cell Virtual Cytometer (Pont et al., 2020). The Score and Gate procedure comprises five sequential gating steps, here applied starting from the ($n=17,803$) PBMC sub-dataset alone:

1. Positive selection of double negative cells [= T and NK lineages ($n=11,768$)] from the scatterplot of ‘B cell’ and ‘Myeloid cell’ signatures.
2. Scatterplot of ‘B cell’ signature against the addition of ‘CD8AB’ and ‘TCR $\gamma\delta$ ’ signatures to positively select the double positive cells [= non-CD4 T cells ($n=6,162$)].
3. Scatterplot of ‘CD8ab’ signature against ‘TCR α constant gene *TRAC*’ signature to digitally extract double-positive cells [= $\alpha\beta$ T CD8 lymphocytes ($n=3,680$)] on the one hand, and negative cells [= $\gamma\delta$ T ($n=2,161$) plus CD4CD8-double negative $\alpha\beta$ T cells] on the other hand.
4. Scatterplot of the addition of ‘CD3 complex’ and ‘TCR α constant gene *TRAC*’ signatures against the addition of ‘CD3 complex’ and ‘TCR $\gamma\delta$ ’ signatures to extract the ‘CD3 complex’-‘TCR $\gamma\delta$ ’ double-positive cells [= $\gamma\delta$ T lymphocytes ($n=580$, 3% of initial PBMC)].

TCR subtyping by compensated scores of TCRV γ 9 and TCRV γ non9 cells Since $\gamma\delta$ T lymphocytes express either the *TRGC1*-encoded TCRV γ 9 or the *TRGC2*-encoded TCRV γ non9 in a mutually exclusive fashion, the extracted $\gamma\delta$ T lymphocytes were classified on ‘*TRDC*, *TRGC1*’ positive cells [=TCRV γ 9 cells ($n=312$)] or ‘*TRDC*, *TRGC2*’ positive cells [=TCRV γ non9 cells ($n=268$)] using a compensated version of these two signatures. Compensated scores are obtained by multiplying the score of the geneset of interest, here $GSS_{TCRV\gamma 9}$, by its difference to its complementary geneset ($GSS_{TCRV\gamma 9}$ minus $GSS_{TCRV\gamma non9}$):

$$GSS_{TCRV\gamma 9 comp} = GSS_{TCRV\gamma 9} * (GSS_{TCRV\gamma 9} - GSS_{TCRV\gamma non9}) \quad (1)$$

Scatterplots of compensated scores for the two complementary genesets $GSS_{TCRV\gamma 9}$ and $GSS_{TCRV\gamma non9}$ unambiguously identify the TCRV γ 9 or TCRV γ non9 subset of each $\gamma\delta$ T lymphocyte (Figure S10b).

Validation of the Score and Gate method of digital extraction The method was validated with two different scRNAseq dataset: our formerly depicted dataset (Pizzolato et al., 2019) of purified $\gamma\delta$ T lymphocytes and a CITEseq dataset of PBMC. When applied to the ($n=7,449$) purified $\gamma\delta$ T cell sub-dataset, this same

score and gate strategy extracted ($n=5,542$) $\gamma\delta$ T cells (74% sensitivity). Given their already known TCRV $\delta 1$ /TCRV $\delta 2$ subtype, the TCRV $\gamma 9$ /non9 subdivision delineated ($n=2,328$) TCRV $\gamma 9$ V $\delta 2$, ($n=1,993$) TCRV γ non9V $\delta 1$, ($n=817$) TCRV γ non9V $\delta 2$, and ($n=404$) TCRV $\gamma 9$ V $\delta 1$ cells. Notwithstanding the equal rates of annotated TCRV $\delta 1$ and TCRV $\delta 2$ cells deliberately composing this sub-dataset (Pizzolato et al., 2019), such results confirmed the prominence of TCRV $\gamma 9$ V $\delta 2$ cells over all the other TCR subsets of blood $\gamma\delta$ T, and the preferential pairings of TCRV $\gamma 9$ (85%) with TCRV $\delta 2$, and of TCRV γ non9 (71%) with TCRV $\gamma 1$ (Figure S10 c). In the UMAP, ($n=5,537$ out of the 5,542) extracted $\gamma\delta$ T cells are embedded in the T cell clusters (Figure S10 d) showing the $\gamma\delta$ T cell detection specificity by score and gate had improved (99.9 vs 95%) in earlier method (Pizzolato et al., 2019), and successfully extracted those $\gamma\delta$ T cells embedded in CD4 and CD8 T cells clusters.

Since CITEseq datasets provide both transcriptomes and immune phenotypes of single cells (Stoeckius et al., 2017), the same score and gate sequence was also applied to our CITEseq dataset of 3k PBMC from a healthy donor (GSE144434) (Pont et al., 2020). This extracted ($n=137$) $\gamma\delta$ T cells (4.7% of PBMC, encompassing $n=81$ TCRV $\gamma 9$ plus $n=56$ TCRV γ non9 cells) of cell surface CD3⁺CD4⁺CD8⁺ phenotype, and embedded with T CD8 and NK cells in UMAP (Figure S11), as expected. These results validated the score and gate method, and the lymphocytes extracted from the CITEseq dataset were integrated to the control datasets, totalizing ($n=6,259$) $\gamma\delta$ T and ($n=4,405$) T CD8 lymphocytes. The integrated (cell x gene) matrices of control blood $\gamma\delta$ T and T CD8 single cells, respectively annotated for pseudotime and differentiation hallmarks in Tables S2, S3 are also provided as resources in Tables S6, S7.

Extraction of TILs from public scRNAseq datasets of tumor samples The scRNA-seq of tumor lesions from 3 patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL) were produced for this study, and additional datasets of tumors from other cancers were downloaded from public resources (GEO, EGA, and AE). These encompassed tumor samples from cutaneous T cell lymphoma (CTCL) (Gaydosik et al., 2019), Hodgkin lymphoma (HL) (Aoki et al., 2020), lung adenocarcinoma (LUAD) (Lambrechts et al., 2018; Kim et al., 2020), breast carcinoma (BRCA) (Azizi et al., 2018), triple negative breast cancers (TNBC) (Savas et al., 2018), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) (Cillo et al., 2020), hepatocellular carcinoma (HCC) (Zheng et al., 2017), basal cell carcinoma (BCC) (Yost et al., 2019), and melanoma (MEL) (Sade-Feldman et al., 2018) (Tables 5). The same score and gate procedure was applied to the pre-processed and quality controlled datasets for digital extraction of $\gamma\delta$ T ($n= 5,950$) and T CD8 ($n= 61,485$) cells, called TILs. From the CTCL samples, the malignant T lymphocytes were filtered out from TILs by gating out those cells overexpressing the marker gene *TOX* and the CTCL-specific 17 gene signature (Gaydosik et al., 2019). The integrated (cell x gene) matrices of all control blood and TILs-derived $\gamma\delta$ T and T CD8 single cells, respectively annotated for pseudotime and differentiation hallmarks in Tables S2, S3 are also provided as resources in Tables S6, S7.

Trajectory Inference After the digital extraction of $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes from normal and cancer samples, both control and TILs were integrated, independently for each lineage ($\gamma\delta$ T and T CD8), by using Seurat (R package) (Stuart et al., 2019), as described above. The final integrated expression matrices contained 36,417 features across 13,536 samples for $\gamma\delta$ T, and 76,892 features across 66,211 samples for T CD8. Next, the $\gamma\delta$ T and T CD8 integrated matrices were independently used for maturation trajectory inference using dynverse (collection of R packages), which provide more than 45 different methods for trajectory inference (TI). The TI was calculated following the recommended workflow (Saelens et al., 2019). Briefly, the normalised (log2) of raw expression data, and UMAP coordinates were used as an input. The most suitable STI methods for our datasets was determined by applying 'guidelines' function (dynverse on R) where Slingshot, PAGA, PAGA-T and Minimum Spanning Tree (MST) returned comparable trajectories for $\gamma\delta$ T and T CD8 (shown for T CD8 in Figure S12). The shorter computational times led us to select MST to infer the maturation trajectories of the $\gamma\delta$ T and T CD8, independently ('ti_mst' function, dynverse on R), with default settings. Additional signatures ('Tn' and 'Teff') were scored, as described above, and together with the obtained MST attributes: dimension reduction coordinates 1 and 2 (MST1 and MST2), milestones and pseudotime, were used to define the root of the trajectory ('add_root' function) of the $\gamma\delta$ T and T CD8 lymphocytes. Of note, MST attributes allow multiple visualizations in R (Figure S13). The data were visualized as pseudotimed trajectories (see below).

Pseudotimed trajectories The pseudotimed trajectory is a bidimensional representation of trajectory inferred for any single cell (p) in which (x,y,z) are the MST coordinates for pseudotime, MST1, and MST2, respectively. The *dim_proj* method takes each cell's (x,y,z) from this 3-dimension space (X: pseudotime,

Y: MST1, Z: MST2) and projects them in a 2-dimension plane where pseudotime is one of these dimensions (XoY'). Between the 3 orthonormal dimensions (XYZ) and the projection plane (XoY'), there is a rotation angle (ZoY') called β (Figure S14 a). The new projected coordinates (x,y') of the cell p are calculated as follows:

$$o'p^2 = y^2 + z^2 \quad (1)$$

$$\cos(\alpha + \beta) = o'y' / o'p \quad (2)$$

So the new Y coordinate y' of p projection in the plane is:

$$o'y' = \sqrt{(y^2 + z^2)} * \cos(\alpha + \beta) \quad (3)$$

$$o'y' = \sqrt{(y^2 + z^2)} * \cos(\arctan((y/z) + \beta)) \quad (4)$$

To avoid negative values, the whole trajectory was translated by adding the minimal coordinates (y_{min} , z_{min}) of the trajectory cells to the initial (y, z) coordinates:

$$o'y' = \sqrt{(y + y_{min})^2 + (z + z_{min})^2} * \cos(\arctan((y + y_{min}) / (z + z_{min})) + \beta) \quad (5)$$

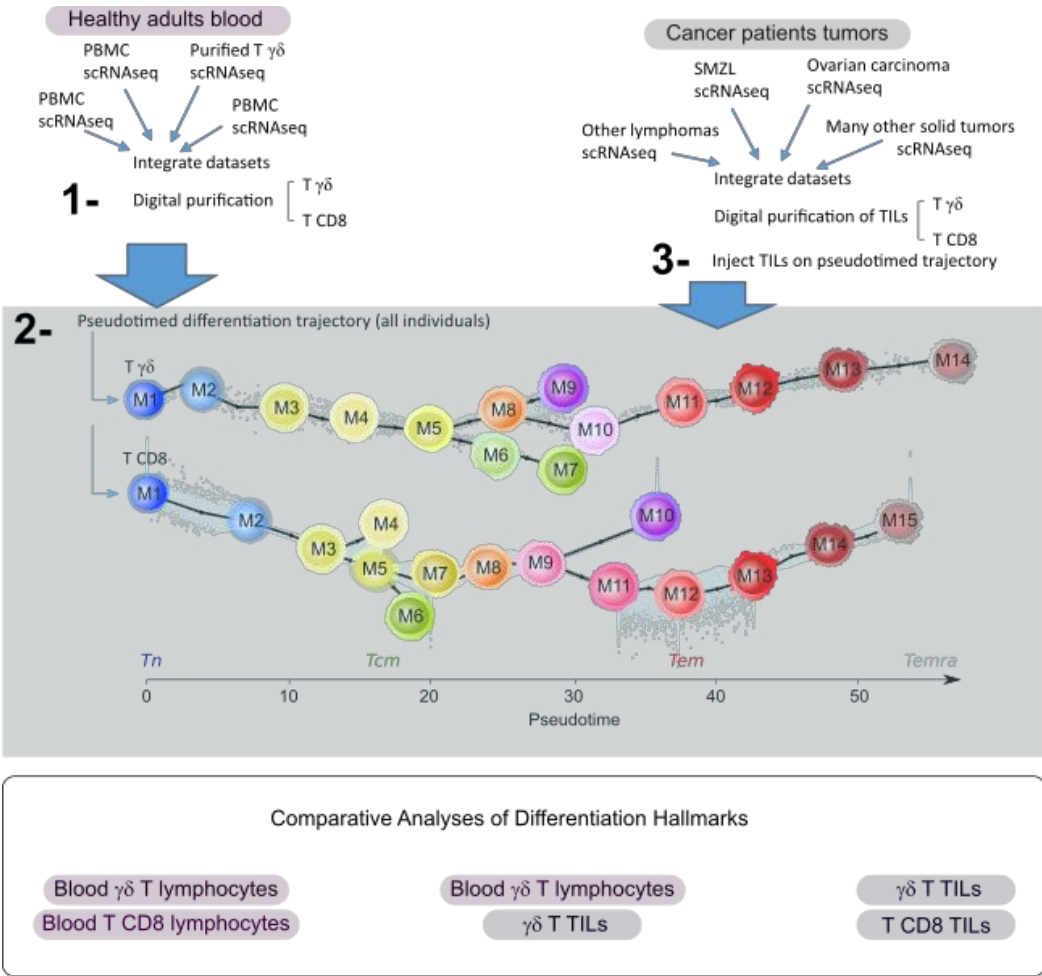
The resulting trajectory using only cell's coordinates (x, y') is called pseudotimed trajectory. Of note, although the trajectory itself is independent of the rotation angle β , selecting this latter allows to optimize visualization of the same trajectory and its eventual branches (Figure S14 b).

Heatmaps Heatmaps of gene expression level (UMI mean) per milestone were generated with color scale based on the z-score distribution per row, and shown from row min (purple) to row max (yellow) (Figures 1 c, 2 b). Heatmaps of TDEG expression level (mean per milestone) were generated with color scale based on the z-score distribution per row, and shown from row min (blue) to row max (red) (Figure S4). Heatmaps of multigene signature score per milestone (milestone mean) were generated by computing scores with Single-Cell Signature Explorer (Pont et al., 2019) as depicted above, with color scale based on the z-score distribution per row, and shown from row min (white) to row max (dark red). Heatmaps of cell counts per milestone were generated as fractions of the row total, and shown from row min (white) to row max (dark blue) (Figure S8 a). Heatmaps of cell pseudotime (linear scale of purple) were shown overlaid on gene signature scatterplots (Figure S5 a).

Classifications The cell classifications Ttrm and Tex were performed by 'at least one binary' as follows. The specified single cells were scored for several reference gene signatures (Table S1). For Tex classification, the reference Tex signatures were five published and partially overlapping Tex genesets (Chihara et al., 2018; Alfei et al., 2019; Khan et al., 2019; Tosolini et al., 2016; Balança et al., 2020). For each signature, a cut-off was defined as the maximal score of the (n=3,680) control $\gamma\delta$ T CD8 lymphocytes extracted from healthy adults PBMC. This threshold defined the cell's binary (1: cell score > threshold, 0: otherwise). The Tex cut-offs were: 3.9 for 'Chihara_IL27_Coinhib_module' (Chihara et al., 2018); 0.52 for 'Alfei_d20_tox' (Alfei et al., 2019); 0.22 for 'Khan_Tox_OverExpressed_genes' (Khan et al., 2019); 0.5 for 'Tosolini_NHL_IEGS33' (Tosolini et al., 2016); and 0.16 for 'Balanca_QP_genes' (Balança et al., 2020). For each TIL, the five Tex binaries were summed, and any TIL with a non-zero sum of binaries was classified Tex. The Ttrm classification was applied likewise using six reference and partially overlapping Ttrm signatures from the literature (Kumar et al., 2017; Wu et al., 2020). The binarizing cutoffs established with the control T CD8 lymphocytes were: 0.46 for 'Kumar_13g_Ttrm'; 0.3 for 'Kumar_3g_Ttrm' (Kumar et al., 2017); 3.72 for 'Wu_Tcellcluster4.1_trm'; 2.6 for 'Wu_Tcellcluster8.3_trm'; 2.8 for 'Wu_Tcellcluster8.3b_trm'; 4.2 for 'Wu_Tcellcluster8.3c_trm' (Wu et al., 2020). These Ttrm binaries were summed, and any TIL with a non-zero sum of Ttrm binaries was classified Ttrm. The cytolytic T cell infiltrates of tumors were arbitrarily classified by total cytolytic (T CD8 + $\gamma\delta$ T) TIL counts as deserts (D, <100 TILs), classic (C, 100-1000 TILs), or inflamed (I, >1000 TILs). The Tex classification from the flow cytometry data was based on both median (PD-1^{hi}TIM-3⁺)>8 % and median (PD-1^{hi}CD39⁺)>12%. The reactivity of tumor infiltrates (TI) from ICB-treated MEL and BCC patients was classified as TI-R (reactive)/TI-NR (non-reactive) based on the difference of total TIL counts (post-pre ICB therapy) by TI-R: $\Delta > 0$, else TI-NR.

Data visualization The scRNAseq data visualization softwares currently available allow users to visualize only one layer of information at a time. So we developed Single-cell Multilayer Viewer, a serverless software for visualization of up to 5 layers of information. It is available on GitHub repository: <https://github.com/MarionPerrier/scMLV>. Single-cell Multilayer Viewer allows to merge and visualize up to 5 layers of quantitative and qualitative variables, alone or in combination. Briefly, it takes as input a matrix (tsv format file) of cell Ids as rows with information variables as columns. Information variables may comprise among others, UMAP, and/or MST coordinates, pseudotime, dimp_proj (projection of MST coordinate on pseudotime, see above), single gene expression UMI, multigene signature scores, and quantitative or qualitative cell annotations (e.g. milestones, donor, tissue type, cell classification, etc.). Here, pseudotimed trajectories were drawn using (pseudotime, dimp_proj) as (x,y) coordinates, and the additional information layers were signature scores (Figures 1 d, 2 c), cell type (Figure 1 b), cell classes (Figures 1 a, 2 a, 4 c, S6 a, etc.) as depicted in text. Quantitative layers were represented by color-scale from grey to the specified color (Figures 5 a, 6, 7 a), while qualitative layers were represented by shapes (Figures S11), colors (Figures 5 a, 6 a, 7 c), and/or sizes (Figures S8 b, S11). The resulting plots can be exported as svg or png format files.

Graphical Abstract



Highlights

- Score and Gate Method for digital purification of $\gamma\delta$ T lymphocytes from any scRNAseq dataset
- a public route of $\gamma\delta$ T cell differentiation and resource data including single cells, genes, and hallmarks
- translation profiles regress likewise during cytotoxic differentiation of $\gamma\delta$ T and T CD8 cells
- qualitative and quantitative coherence of $\gamma\delta$ T and T CD8 infiltrating human tumors

1211 **Key Resource Table**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-human CD8a clone RPA-T8, BV421	BioLegend	cat # 301036; RRID: AB_10960142
anti-human CCR7 clone G043H7, PE-Cy7	Biolegend	cat # 353226; RRID: AB_11126145
anti-human CD45RA clone REA1047, PE-Vio615	Miltenyi Biotec	cat # 130-117-745; RRID: AB_2732977
anti-human S6 Ribosomal Protein clone 54D2,	Cell Signaling Technology	cat # 5317S; RRID: AB_10694920
anti-human CD3 clone UCH-T1, PE	BD Biosciences	cat # 555333; RRID: AB_395740
anti-human CD4 clone RPA-T4, BUV395	BD Biosciences	cat # 564724; RRID: AB_2738917
anti-human CD8 clone RPA-T8, V500	BD Biosciences	cat # 560774; RRID: AB_1937325
anti-human CD25 clone B1.49.9, APC	Beckman Coulter	cat # B09684; RRID: AB_2861133
anti-human CD127 clone A019D5, APC-Cy7	Biolegend	cat # 351348; RRID: AB_262957
anti-human PANTCRgd clone B1.49.9, FITC	Beckman Coulter	cat # B49175; RRID: AB_2861133
anti-human CD197 (CCR7), PerCP-Vio700	Miltenyi	cat # 130-108-288; RRID: AB_2655960
anti-human CD45RA clone L48, PE-Cy7	BD Biosciences	cat # 337186; RRID: AB_2828012
anti-human PD-1 clone EH12.1, BUV737	BD Biosciences	cat # 565299; RRID: AB_2739167
anti-human CD366 (TIM-3) clone 7D3, BV421	BD Biosciences	cat # 565562; RRID: AB_2744369
anti-human CD39 clone TU66, BV650	BD Biosciences	cat # 563681; RRID: AB_2738370
anti-mouse CD3 clone 145-2C11, BV786	BD Biosciences	cat # 564379; RRID: AB_2738780
anti-mouse CD4 clone GK1.5, BUV496	BD Biosciences	cat # 564667; RRID: AB_2722549
anti-mouse CD8 clone 53-6.7, BUV737	BD Biosciences	cat # 564297; RRID: AB_2722580
anti-mouse CD45.2 clone 104, FITC	BD Biosciences	cat # 553772; RRID: AB_395041
anti-mouse PD1 clone J43, BUV396	BD Biosciences	cat # 744549; RRID: AB_2742320
anti-mouse TIGIT clone GIGD7, PerCPeF710	eBiosciences	cat # 46-9501-82; RRID: AB_11150967
anti-mouse TIM3 clone RMT3-23, BV421	BD Biosciences	cat # 747626; RRID: AB_2744192
anti-mouse CTLA4 clone UC10-4B9, PeCy7	eBiosciences	cat # 25-1522-82; RRID: AB_2688105
anti-human CD19 clone HIB19, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 302263
anti-human TIGIT clone A15153G TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 372727
anti-human PDL1 clone 29E.2A3, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 329749
anti-human CD3 clone UCHT1 TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 300477
anti-human CD8a clone RPA-T8, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 301069
anti-human CD4 clone RPA-T4, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 300565
anti-human PD-1 clone EH12.2H7, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 329961
anti-human CD45R0 clone UCHL1, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 304257
anti-human CD14 clone M5E2, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 301857
anti-human CD56 clone QA17A16, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 392423
anti-human CD25 clone BC96, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 302647
anti-human CD45RA clone HI100, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 304161
anti-human IgG1 κ isotype clone MOPC-21, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400185
anti-human IgG2a κ isotype clone MOPC-173, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400291
anti-human IgG2b κ isotype clone MOPC-11, TotalSeq-B ADT	BioLegend	cat # 400379
Biological samples		
human blood and splenic lymphoma samples	EFS, IUOTO	N/A (REC approval numbers: nDC-2009-989)

human HNSCC, OVCAR, and UTCAR tumor biopsy samples

IUCTO

N/A (REC approval numbers: (nDC-2016-2656 and DECIdE protocol NCT03958240))

Chemicals & Reagents

RPMI 1640 medium	Dutscher	cat # L0498-500
Fetal calf serum	ThermoFisher Scientific	cat # 10270-098
DMSO	Sigma-Aldrich	cat # CP-10
PBS	GIBCO	cat # 14200-067
Ficoll-Hypaque	GE Healthcare	cat # CMSMSL01-0U
HEPES	GIBCO	cat # 15630056
L-Glutamine	GIBCO	cat # 25030081
Penicillin-Streptomycin	GIBCO	cat # 15140122
Sodium Pyruvate	GIBCO	cat # 11360039
EDTA	Invitrogen	cat # 15575-038
Puromycin	Millipore	cat #MABE343; RRID: 1000-70
5'-Atto647-Oligo d(T)30	Integrated DNA Technologies	N/A
anti-human CD45 (TIL) MicroBeads	Miltenyi	cat # 130-118-781
RNase Inhibitor	Clontech	cat # 2313A
Triton X-100	Sigma-Aldrich	cat # T9284
dNTPs	ThermoFisher	cat # 10319879
ERCC RNA Spike-in mix	Ambion	cat # 4456740
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase	Clontech	cat # 639538
AMPure XP beads	Beckman Coulter	cat # A63881
96-well plates	Falcon	cat # 353077

Commercial Assays

Chromium Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3, 4 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000092
Chromium Single Cell B Chip Kit, 48 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000073
Chromium i7 Multiplex Kit, 96 rxns	10x Genomics	cat # PN-120262
Chromium Single Cell 3' Feature Barcode Library Kit, 16 rxns	10x Genomics	cat # PN-1000079
High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit 1-6000bp	Agilent Technologies	cat # DNF-474-0500
Lib Quantification Kit Illumina universal	Roche Diagnostics	cat # 0796014000
Lib Quantification Standards 0-6	Roche Diagnostics	cat # 07960409001
NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles)	Illumina France	cat # 20024907
SPRIselect Reagent Kit	Beckman Coulter	cat # B23317
Phix Control v3 Référence FC-110-3001	Illumina France	cat # FC-110-3001
The Human T Lymphocytes Enrichment Set-DM	BD biosciences	cat # 557874
Transcription factor staining buffer set	eBioscience	cat # 00-5523
Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec	cat # 130-090-101
Mix-n-stain Antibody Labeling kit	Biotum	cat # 92272

Deposited Data

10x Chromium raw data	This paper	pending
Processed count matrices and metadata	This paper	attached to this file

Experimental Models: Cell lines

TC1 cells expressing the HPV16 E6 and E7 proteins	T.C. Wu (Johns Hopkins University, Baltimore, USA)	N/A
---	--	-----

Experimental Models: Organisms and Strains

C57BL/6 mice	Janvier Labs	C57BL/6Rj
--------------	--------------	-----------

Softwares, Algorithms and versions

Single-cell Multilayer Viewer	This paper	https://github.com/MarionPerrier/scMLV
Single-Cell Signature Scorer	(Pont et al., 2019)	https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/single-cell-signature-explorer
Single-Cell Virtual Cytometer	(Pont et al., 2020)	https://sites.google.com/site/fredsoftwares/products/single-cell-virtual-cytometer
Seurat v3.2.2	(Satija et al, 2015)	https://satijalab.org/seurat/
dynov0.1.2	Github via devtools	https://dynverse.org/
tidyverse v1.3.0	Github via devtools	https://dynverse.org/
Prism 8 v8.4.1	GraphPad Software	N/A
Flowlogic v7	Miltenyi Biotec	cat # 150-000-382
CellRanger	10x Genomics	N/A
R	R Development Core Team	https://www.r-project.org/
Cytobank	Beckman Coulter	http://www.cytobank.org

Others

10x library preparation protocol	10x Genomics	https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/library-prep
----------------------------------	--------------	---

Conclusion

Cette étude utilise une stratégie d'analyse scRNAseq innovante et permet de caractériser les TIL $\gamma\delta$ chez les patients, dans plusieurs types tumoraux. Les TIL $\gamma\delta$ partagent des caractéristiques observées dans les TIL CD8. En effet, ils ont un profil épuisé mais n'atteignent pas le stade terminal de différenciation, ils expriment des marqueurs de résidence tissulaire, ont une forte capacité cytotoxique et une activité de traduction diminuée.

Les lignées lymphocytaires T CD8 et T $\gamma\delta$ infiltrent les tumeurs dans des proportions différentes, cependant leurs profils de différenciation et fonctionnel sont similaires. Notamment, les deux lignées se comportent comme un sous-ensemble de cellules épuisées et répondent à la thérapie bloquant l'axe PD-1/PD-L1, quels que soient les résultats cliniques des patients.

Ensemble, ces résultats montrent que les TIL $\gamma\delta$ présentent un profil d'épuisement associé à celui des TIL CD8 dans la tumeur des patients.

En conclusion, nous montrons que le microenvironnement de la tumeur est capable d'induire l'épuisement des LT CD8 et CD4 mais également celui des LT $\gamma\delta$ qui adoptent des comportement transcriptionnels et phénotypiques similaires.

CONCLUSION

Durant mes travaux de thèse, j'ai pu caractériser les LT CD8 et CD4 dans la tumeur de patients atteints de cancer des VADS, de l'ovaire et du col de l'utérus. Dans ces trois maladies, les TIL épuisés ont le même profil pour chaque lignée CD8 et CD4. D'autre part, je montre que les LT $\gamma\delta$ présentent un profil d'épuisement similaire dans la tumeur.

Les TIL CD8 épuisés expriment plusieurs PCI, les marqueurs d'épuisement CD39 et TOX et des marqueurs de résidence tissulaire. Ces LT ont perdu l'expression de la molécule de co-stimulation CD28 mais possèdent un fort potentiel cytotoxique et expriment CXCL13, qui participe à la formation des TLS. Les LT présents au site tumoral ne sont pas tous spécifiques des Ag tumoraux. En revanche, seulement les TIL CD8 spécifiques de la tumeur acquièrent ce phénotype épuisé. De façon intéressante, nos expériences *in vitro* montrent que les anticorps anti-PD-1 peuvent réactiver les fonctions effectrices des TIL CD8 spécifiques des Ag tumoraux et augmenter la prolifération des LT CD8 CD28⁺ spécifiques de la tumeur en périphérie. Nous avons associé une infiltration élevée de TIL CD8 épuisés, identifiés par le marqueur TIM-3, à la réponse clinique et à la survie des patients traités par des anti-PD-1/PD-L1.

Les TIL CD4 épuisés expriment des niveaux élevés de PD-1 associés au marqueur CD39 et produisent de faibles quantités de cytokines. Ils partagent certaines caractéristiques des TIL CD8 épuisés, comme l'expression de TOX, CXCR6, CXCL13 et la spécificité aux Ag tumoraux. Le blocage de PD-1 sur ces TIL CD4 permet leur activation conduisant à l'augmentation de l'expression de CD40L, la maturation des DC et par conséquent la prolifération des TIL CD8 spécifiques de la tumeur.

Sur la base de ces résultats, nous proposons un modèle dans lequel les LT CD8 PD-1⁺ spécifiques de la tumeur circulants atteignent le site de la tumeur où ils sont stimulés par les DC, prolifèrent, acquièrent une capacité cytotoxique élevée, des marqueurs Trm pour résider *in situ* et, enfin, un profil épuisé suite à la stimulation chronique. Dans le cadre du blocage de l'axe PD-1/PD-L1, l'activité effectrice des TIL CD8 épuisés spécifiques des Ag tumoraux est augmentée (Figure 37). D'autre part, la prolifération des LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux peut être améliorée i) par le blocage direct de PD-1 sur les LT CD8 circulants et ii) par la relance de l'activité auxiliaire des TIL

CONCLUSION

CD4 spécifiques de la tumeur qui augmentent la maturation des DC et amènent indirectement à la prolifération des LT CD8 (Figure 37).

Ces résultats décrivent, par diverses approches expérimentales, les profils d'épuisement des TIL chez l'homme ainsi que des mécanismes d'action des anticorps anti-PD-1 sur les populations de LT CD8 et CD4. Ces données montrent que les TIL spécifiques de la tumeur ne sont pas épuisés dans un stade terminal irréversible mais sont plutôt dysfonctionnels à cause de la stimulation chronique dans le TME immunosuppresseur et peuvent être réactivés par les anti-PCI. De plus, nous mettons en évidence des biomarqueurs potentiels de réponse aux traitements bloquant l'axe PD-1/PD-L1. Ceci pourra être utile pour la mise au point de nouvelles combinaisons thérapeutiques et pour la sélection des patients susceptibles de répondre aux traitements par anticorps anti-PD-1.

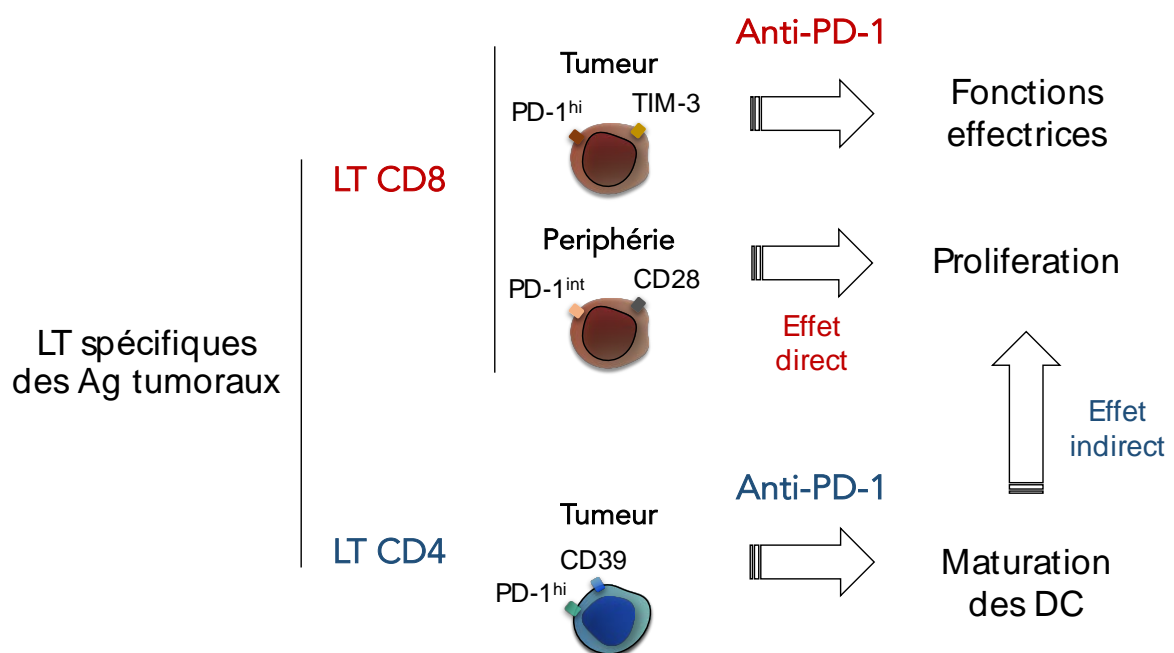


Figure 37 : Mécanismes d'action des AcM anti-PD-1 sur les LT CD8 et CD4 spécifiques des Ag tumoraux.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Modèles d'étude

Les cancers des VADS, du col de l'utérus et de l'ovaire, sont les 3 types tumoraux que nous avons pris comme modèles d'étude pour mes travaux de thèse. Ces 3 types de tumeur sont résistants, pour les cancers gynécologiques^{705,708}, ou partiellement répondeur, pour les cancers des VADS⁷¹⁴, au blocage des PCI en clinique. D'autre part, le cancer de l'ovaire est diagnostiqué à un stade très tardif, le cancer du col de l'utérus se déclare après un développement chronique des lésions et les cancers des VADS sont généralement diagnostiqués à un stade avancé. Ils constituent alors des modèles pertinents pour l'étude de l'épuisement des TIL ainsi que des mécanismes de résistance au blocage de PD-1, puisqu'il est supposé que les TIL présents au site de ces tumeurs sont épuisés et résistent au traitement dans la plupart des cas.

Dans ce contexte, il serait intéressant de comparer les profils et les proportions de TIL épuisés retrouvés dans nos 3 cohortes modèles avec les TIL présents dans les tumeurs qui montrent des taux de réponses cliniques à l'immunothérapie élevés, comme le mélanome et le cancer bronchique.

L'épuisement des LT a été découvert dans des modèles murins d'infection virale chronique de type LCMV, puis retrouvé dans des modèles murins de tumeur. La principale cause d'apparition de l'épuisement est la stimulation antigénique persistante. Contrairement aux infections virales, le TME fournit des stimuli immunosuppresseurs supplémentaires qui modulent l'épuisement. De plus, les modèles murins de tumeurs, qui sont établies en quelques semaines, ont des cinétiques plus rapides que chez l'homme. Ces différences entre les modèles d'infection virale chronique ou de tumeur chez la souris et les tumeurs humaines, suggèrent que l'épuisement des LT dans les modèles décrits pourrait ne pas être représentatif de celui retrouvé dans les tumeurs des patients. La première analyse scRNAseq de tumeurs de patients atteints de mélanome montre une population de TIL dysfonctionnels⁷³³. Malgré des caractéristiques communes avec les modèles LCMV, comme la surexpression des PCI et la perte de la sécrétion de cytokines, les TIL épuisés chez l'homme se distinguent par divers processus. En effet, le profil transcriptomique des TIL épuisés chez les patients diffère de celui des LT épuisés

dans les infections virales chez l'homme⁵³⁵, des TIL épuisés dans les modèles murins⁷³⁴ et des LT épuisés dans les infections virales chroniques chez la souris⁵⁶⁴. L'épuisement des TIL semble peu modélisable, son étude directement chez les patients est idéale.

2. L'épuisement, une lignée de différenciation distincte

Il est bien connu que l'activité des LT est maintenue pendant de longues périodes après une stimulation répétitive seulement en présence de LT mémoires qui possèdent une capacité d'auto-renouvellement, une réactivité rapide et persistent à long terme. Dans le cancer, la stimulation antigénique prolongée et le contrôle de la croissance tumorale lors de la phase d'équilibre parfois durable, suggèrent que les TIL ont la capacité à conserver la mémoire de leur cible. Nos résultats montrent que les LT épuisés dans la tumeur des patients sont effecteurs mémoires. Néanmoins, l'état d'épuisement a été défini comme un état indépendant des stades mémoires et effecteurs. Une des explications serait que les LT mémoires par définition, persistent même après disparition de l'Ag. Alors que dans le cas des tumeurs, la stimulation antigénique est persistance. Les LT épuisés ne sont alors pas définis comme mémoires mais acquièrent d'autres caractéristiques. Nos données indiquent que les TIL épuisés ont une capacité réduite de sécrétion de cytokine et de prolifération. De plus, ces cellules ont perdu l'expression de la molécule de co-stimulation CD28. Ces caractéristiques diffèrent de celles retrouvées chez les LT mémoires à l'état physiologique. Il semblerait que les TIL sont au stade effecteur mémoire lors de l'infiltration dans la tumeur mais leur différenciation se dirige vers un autre état, indépendant du stade mémoire, appelé épuisé durant la stimulation chronique de leur TCR dans le TME.

Il serait intéressant de vérifier dans des modèles *in vivo* ou *in vitro*, si la diminution de la charge antigénique tumorale permet de retrouver un phénotype mémoire des LT et *in fine*, d'identifier si le stade d'épuisement est réversible. Notamment, lors du traitement par AcM anti-PD-1 des LT *in vitro*, nous pourrions vérifier si les LT qui répondent à la thérapie, acquièrent un stade de différenciation mémoire ou effecteur.

3. Acquisition progressive de l'épuisement

Les spécialistes de l'épuisement sont d'accord sur le fait que celui-ci est induit à la suite d'une stimulation persistante du TCR qui reconnaît l'Ag tumoral, sous l'influence des facteurs immunosuppresseurs du TME. Certaines études montrent qu'un amorçage sous-optimal dans les LN pourrait également, en combinaison avec les deux autres causes, participer à la mise en place de l'épuisement⁸⁸. Nos résultats sont en accord avec ces données puisque dans la tumeur, seulement les LT spécifiques des Ag tumoraux sont épuisés. De plus, nous montrons que les LT CD4 conventionnels (Tconv), non Treg, acquièrent également un phénotype épuisé, ce qui pourrait expliquer l'amorçage des LT CD8 non optimal. Cependant, la confirmation de cette hypothèse nécessitera l'analyse de l'état des LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux dans les LN drainant. De plus, il sera intéressant de réaliser une caractérisation approfondie, transcriptomique et/ou phénotypique, des LT CD8 circulants spécifiques des Ag tumoraux. Nous avons montré que ces LT exprimaient des niveaux intermédiaires de PD-1 et de TIGIT et ces analyses pourraient permettre de déterminer leur affiliation à un stade « mémoire » ou « épuisé précoce ».

Il a été montré que les LT épuisés dans la tumeur sont hétérogènes aux niveaux transcriptomique et fonctionnel et représentent plusieurs états de dysfonction⁷³⁵. De plus, une diversité phénotypique dans les TIL épuisés a été illustrée par la possibilité de plusieurs combinaisons et niveaux d'expression des récepteurs d'inhibition et de co-stimulation⁷³⁶. Des études montrent que l'état d'épuisement est divisé en plusieurs stades qui évoluent selon un gradient⁷³⁷. Il débute par un état pré-épuisé, puis un épuisement précoce et enfin tardif. Ceci traduit une évolution progressive de l'épuisement. Dans nos travaux, nous montrons que l'acquisition des PCI et l'augmentation de leur niveau d'expression ainsi que d'autres marqueurs d'épuisement, se fait de manière progressive dans les populations de TIL CD8 et CD4 Tconv. En parallèle, les TIL CD8 perdent l'expression de CD28. Les analyses de trajectoires, basées sur les données de scRNAseq, confirment que l'acquisition des marqueurs d'épuisement se fait selon un continuum, jusqu'à l'apparition du stade d'épuisement tardif. La limite entre les différents stades n'est pas bien démarquée.

Au stade précoce, nous montrons que les TIL expriment des niveaux faibles ou intermédiaires de PCI et des niveaux plus élevés de marqueurs de différenciation précoce comme *TCF7*, *CCR7* et *IL7R*. Les données de la littérature indiquent, en effet,

que les TIL TCF1⁺ correspondent aux stades de pré-épuisement et d'épuisement précoce⁵⁶⁸. Les études actuelles utilisent des nomenclatures différentes pour décrire l'évolution de l'épuisement au site de la tumeur. Cependant, l'ensemble des données partagent le fait que les LT CD8 épuisés atteignent un stade d'épuisement tardif, caractérisé notamment par l'expression des marqueurs Trm, LAG-3, CD39, PD-1^{hi} et TIM-3⁷³⁸. Ceci rejoint nos résultats qui montrent que les TIL CD8 spécifiques des Ag tumoraux stimulés *in situ* sont au stade d'épuisement tardif, ils expriment les marqueurs d'épuisement décrits dans la littérature et ont une capacité limitée à sécréter des cytokines.

L'épuisement des TIL CD4 a été moins étudié que celui des TIL CD8 et limité aux infections virales chroniques. Nos analyses montrent que les TIL Tconv au stade d'épuisement tardif ne présentent pas exactement le même phénotype que les TIL CD8. Par exemple, nous montrons que l'acquisition de CD39 dans la population de TIL Tconv est induite avant l'expression de TIM-3, contrairement aux TIL CD8 qui acquièrent CD39 une fois le stade d'épuisement tardif TIM-3⁺ est acquis. Ceci pourrait être dû à un degré de stimulation chronique plus faible des TIL Tconv ou suggère qu'ils expriment d'autres marqueurs d'épuisement. Dans les modèles d'infection chronique, l'altération des fonctions effectrices est souvent apparue plus tôt pour les LT CD4 spécifiques du virus que pour les LT CD8⁵⁶⁵. Dans la tumeur des patients, la stimulation est moins soutenue pour les TIL CD4 qui reconnaissent les Ag présentés par les molécules de CMH-II exprimées par les DC uniquement, puisque les cellules tumorales expriment peu ou pas de CHM-II. En contraste, les TIL CD8 reconnaissent le CMH-I exprimé par les deux types cellulaires, la stimulation est plus forte, les mécanismes de mise en place de l'épuisement tardif devraient être plus nombreux. Nous montrons que les TIL Tconv CD39⁺ expriment des niveaux élevés de PD-1 et d'autres marqueurs d'épuisement retrouvés dans les TIL CD8, comme TIGIT, CTLA-4 et TOX. D'autre part, la population de TIL Tconv PD-1^{hi}CD39⁺ épuisée contient des cellules spécifiques des Ag tumoraux et sécrète des quantités plus faibles de cytokines en comparaison aux autres TIL Tconv. Ceci est en accord avec le fait que la stimulation chronique est décrite comme le principal facteur responsable de l'épuisement. Il est à noter que ces résultats sont indépendants de l'expression de TIM-3, puisqu'aucune différence n'est retrouvée dans la production de cytokines quand nous distinguons les Tconv TIM-3^{hi} des TIM-3^{low}, parmi les Tconv PD-1^{hi}CD39⁺. Ces données montrent que les TIL Tconv épuisés sont caractérisés par un marqueur différent des TIL CD8 au

stade tardif épuisé. En effet, CD39 représente le marqueur d'épuisement tardif de la lignée Tconv au site de la tumeur.

Nous avons également analysé l'expression des marqueurs CD39 et TIM-3 dans les LT $\gamma\delta$ qui infiltrent la tumeur des patients. Nous avons montré que des proportions élevées de cellules PD-1^{hi}TIM-3⁺ et PD-1^{hi}CD39⁺ sont retrouvées dans les tumeurs qui présentent des niveaux élevés de TIL CD8 et CD4 au stade d'épuisement tardif. Dans cette étude, nous montrons également par analyse scRNAseq que l'épuisement des TIL $\gamma\delta$ est associé à celui des TIL CD8 dans différents types de tumeurs chez les patients. Ces résultats suggèrent que le TME immunosuppresseur semble être suffisamment efficace pour induire l'épuisement de plusieurs populations de LT, dont les cibles sont de nature différente, simultanément dans la tumeur, laissant peu d'espoir pour une réponse anti-tumorale spécifique. Ces caractéristiques semblent être responsables de l'apparition de l'échappement de la tumeur au SI. Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser les conséquences fonctionnelles de l'épuisement des TIL $\gamma\delta$ afin de vérifier si la sécrétion de cytokine est limitée comme pour les TIL CD8 et Tconv au stade d'épuisement tardif.

4. Facteurs intracellulaires responsables de l'épuisement

Dans les premières études sur le dysfonctionnement des LT CD8 dans des modèles murins d'infection virale chronique, les facteurs de transcription T-bet et EOMES ont été identifiés comme des régulateurs majeurs et ont été utilisés pour distinguer les LT des différents stades de dysfonctionnement⁵⁶⁶. La relation claire entre l'expression de EOMES et T-bet et les niveaux d'expression de PD-1 retrouvés dans les infections virales chroniques n'est cependant pas vérifiée dans les cancers humains. Les marquages *ex vivo* de TIL CD8 que nous avons réalisés ont montré que l'expression de ces facteurs de transcription n'était pas cohérente avec l'évolution progressive de l'expression des marqueurs d'épuisement ni avec celle de la molécule CD28 (données non montrées). Ces résultats indiquent que ces marqueurs ne semblent pas adaptés pour l'analyse stricte du stade d'épuisement des TIL chez l'homme. D'autres facteurs pourraient être plus adéquats pour déterminer l'avancée de l'épuisement.

Une étude a établi des degrés de sévérité de l'épuisement⁵⁷⁴, où le facteur de transcription TOX est associé à l'épuisement tardif. Nos données ont vérifié

l'expression de TOX dans les TIL CD8 TIM-3⁺ épuisés ainsi que le gain séquentiel de l'expression de TOX au niveau du site tumoral. Des résultats similaires ont été retrouvés pour les TIL Tconv et nos analyses scRNAseq montrent que les Tconv épuisés sont enrichies en signatures géniques associées au facteur TOX, qui ont été décrites dans d'autres études^{559,560}. De plus, dans un modèle murin de transfert adoptif de LT exprimant des récepteurs CAR, les LT transférés acquièrent un état d'épuisement au niveau du site de la tumeur par des mécanismes dépendant de TOX et TOX2⁵⁶¹. Le facteur de transcription TOX est essentiel pour le développement d'un phénotype dysfonctionnel et n'intervient pas dans le développement des LT CD8 effecteurs et mémoires⁵⁶⁰. Cependant, alors que la perte de l'expression de TOX dans les tumeurs hépatiques de souris a entraîné une réduction de l'expression des RI dans les LT CD8, la capacité à produire des cytokines n'a pas été retrouvée⁵⁶². Ceci suggère qu'un ensemble plus large de facteurs de transcription régule les différents aspects de l'épuisement et/ou que des modifications épigénétiques acquises durant le processus d'instauration de l'épuisement persistent malgré la perte de TOX. En effet, il semblerait qu'il n'y ait pas qu'un seul facteur responsable de l'épuisement des LT dans la tumeur, les mécanismes exacts restent encore à être identifiés.

5. Spécificité tumorale

Puisque la stimulation continue du TCR est la principale cause d'apparition de l'épuisement, l'induction de cet état dans les TIL spécifiques des Ag tumoraux semble évidente.

Pour étudier la spécificité tumorale chez l'homme, de nombreuses études analysent la clonalité des TIL, qui est un substitut permettant d'évaluer l'expansion clonale des LT induite par l'Ag. Il a été démontré que les clones les plus fortement représentés dans les mélanomes sont réactifs aux tumeurs⁷³⁹. L'analyse des répertoires TCR à partir de données scRNAseq a révélé que les TCR récurrents sont plus abondants dans les populations de LT cytotoxiques et dysfonctionnels⁵⁷³. Toutefois, des clones abondants qui ne reconnaissent pas les Ag tumoraux sont également présents dans le TME et, inversement, de petites populations de clones peuvent présenter une réactivité tumorale. Ainsi, la clonalité est une mesure imparfaite de la réponse T anti-tumorale. D'autres approches ont été utilisées pour caractériser les LT spécifiques d'Ag tumoraux dans les tumeurs de patients. Une étude dans le mélanome utilise des marquages tétramère peptide/CMH *ex vivo* pour comparer les LT CD8 spécifiques de

l'Ag tumoral MART-1 en périphérie et ceux infiltrant la tumeur et montre que les TIL spécifiques de la tumeur présentent un profil épuisé⁵⁴⁶. D'autres approches montrent que la réactivité tumorale des TIL *in vitro* est associée à l'expression de marqueurs de dysfonctionnement tels que PD-1, TIM-3 ou LAG-3⁷⁴⁰. De plus, l'expression des marqueurs CD39 et CD103 a été détectée dans des LT spécifiques de la tumeur, et non sur les LT spécifiques d'Ag non tumoraux^{536,537}.

En revanche, la caractérisation des LT spécifiques des Ag tumoraux, identifiés par une méthode robuste, a été limitée aux LT CD8 et n'a pas déterminé de biomarqueur spécifique pouvant associer leur présence aux résultats cliniques des patients.

Dans nos expériences, nous utilisons des marquages tétramère peptide/CMH pour identifier de manière stricte les LT CD8 spécifique de la tumeur. Nous avons utilisé l'Ag tumoral NY-ESO-1 comme modèle et marqué les LT de patientes atteintes de cancer de l'ovaire ayant des réponses adaptatives humorales et cellulaires à cet Ag. Nous avons comparé les TIL CD8 tétramère⁺ avec les LT CD8 tétramères⁺ de la périphérie et avec des TIL CD8 spécifiques d'Ag non tumoraux. De manière intéressante, ces expériences montrent que seuls les TIL CD8 tétramère⁺ acquièrent plusieurs PCI, expriment les marqueurs de Trm et CD39 et correspondent aux LT CD8 en stade d'épuisement tardif. Ces TIL CD8 tétramère⁺ épuisés peuvent être identifiés par le marqueur TIM-3, qui est le dernier PCI acquis au site de la tumeur.

Nous avons également étendu la caractérisation de la spécificité tumorale aux TIL Tconv. A partir de TIL CD4 Tconv d'une patiente présentant des réponses LT CD8 et sérologiques à NY-ESO-1, nous avons cloné *ex vivo* les Tconv à partir de trois populations définies selon l'expression de PD-1 et de CD39 : PD-1^{lo}CD39⁻, PD-1^{hi}CD39⁻ et PD-1^{hi}CD39⁺. Seuls des clones provenant de la population PD-1^{hi}CD39⁺ ont réagi à une stimulation *in vitro* avec des peptides provenant de la protéine NY-ESO-1, en sécrétant des cytokines. Nos données montrent que les LT Tconv spécifiques de l'Ag NY-ESO-1 ne se trouvent que dans la population des TIL Tconv PD-1^{hi}CD39⁺ épuisés. Ces résultats concordent avec un modèle distinct où les TIL CD4 et CD8 CD39⁺ se sont révélés spécifiques des Ag du virus HPV dans les tumeurs malignes induites par le HPV⁷⁴¹.

L'ensemble de ces données montre que les TIL spécifiques de la tumeur acquièrent un phénotype épuisé dans les compartiments CD8 et CD4. De plus, nous avons identifié des biomarqueurs de ces populations de TIL spécifiques et épuisés qui ont

été utile pour explorer leur contribution à l'efficacité clinique de l'immunothérapie bloquant l'axe PD-1/PD-L1.

D'autre part, il a été montré que les LT CD8 spécifiques de la tumeur peuvent différer dans leur phénotype, par exemple en présentant des niveaux d'expression variables de CD39, PD-1, CTLA-4 et LAG-3⁶⁷⁷. Les différents phénotypes identifiés pourraient être dus à une différence de niveau d'affinité du TCR, la présence de facteurs additionnels ou une activité auxiliaire des LT CD4 variable. D'après nos résultats et selon l'apparition progressive de l'épuisement, nous proposons que les LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux sont amorcés dans les LN puis recirculent, ils adoptent un phénotype PD-1⁺TIGIT⁺ (DP). Ces LT CD8 DP rejoignent ensuite la tumeur, où des LT spécifiques d'Ag non tumoraux peuvent également avoir un phénotype DP. Les TIL CD8 spécifiques de la tumeur seulement deviennent PD-1⁺TIGIT⁺ CTLA-4⁺ (TP) et enfin arrivent au stade épuisé terminal PD-1⁺TIGIT⁺CTLA-4⁺TIM-3⁺ (QP) après une stimulation continue du TCR. Les QP résident dans la tumeur et ne recirculent pas grâce à l'acquisition des marqueurs de Trm et CXCR6. La différenciation vers un stade épuisé tardif semble rapide puisque la proportion de TIL spécifiques de la tumeur avec un phénotype DP ou TP que nous avons retrouvée est faible. Ceci pourrait également expliquer les différents phénotypes retrouvés chez les TIL spécifiques de la tumeur.

Afin de vérifier cette hypothèse et de caractériser de manière plus détaillée les LT CD8 et Tconv spécifiques de la tumeur, il serait intéressant d'utiliser des tétramères CMH-I/peptide et CMH-II/peptides barcodés avec des séquences ADN permettant, dans des expériences scRNAseq, d'identifier les cellules spécifiques de l'Ag ainsi marquées. Cette expérience permettra de vérifier les proportions des LT spécifiques de la tumeur dans chaque stade d'épuisement et d'en connaître le profil d'expression génique. Dans la tumeur, on suppose que les TIL au stade d'épuisement tardif, caractérisés par l'expression de TIM-3 pour les CD8 et CD39 pour les Tconv, sont présents dans des proportions largement supérieures aux autres stades d'épuisement. Nous pourrions également utiliser cette technique pour vérifier les variations d'expression des molécules d'inhibition et de stimulation dans les LT spécifiques.

D'autre part, l'utilisation de tétramères contenant des peptides tumoraux différents de l'Ag NY-ESO-1, par exemple HPV pour les cancers des VADS et du col de l'utérus ou des néoAg pour les 3 types tumoraux, lors de marquages *ex vivo* ou d'analyses scRNAseq, pourrait être utile afin de renforcer et de vérifier nos résultats dans d'autres spécificités et d'autres familles d'Ag.

Comme la stimulation chronique dans le TME est la principale cause d'apparition de l'épuisement tardif des TIL, il serait intéressant de comparer le profil d'épuisement des TIL dans le site de la tumeur avec celui des LT spécifiques de la tumeur présents au niveau de métastases et LN. Nos résultats préliminaires indiquent que chez une même patiente présentant un cancer de l'ovaire, les LT CD8 spécifiques de l'Ag NY-ESO-1, identifiés par marquage tétramère *ex vivo*, acquièrent le phénotype épuisé QP dans un LN métastatique alors qu'ils sont DP dans les métastases péritonéales, au même titre que les LT CD8 spécifiques de la périphérie. Ces résultats sont en accord avec une étude qui identifie des microenvironnements immunitaires et des évolutions métastatiques différents selon les sites de la tumeur chez une même patiente⁷⁴².

6. Résidence tumorale

Des études menées chez des patients ont relié l'expression des marqueurs Trm : CD103, CD69 et CD49a, à l'épuisement des LT CD8. Dans une cohorte de cancer du poumon, un sous-ensemble de LT CD8 Trm a montré une expression accrue de marqueurs d'épuisement tels que *HAVCR2*, *PDCD1*, *CTLA4* et *LAYN* par rapport aux cellules Trm des tissus sains adjacents⁷³⁸. D'autres part, les LT CD8 Trm identifiés dans les tumeurs du sein triple négatif étaient caractérisés de manière similaire par des marqueurs qui correspondent à un profil épuisé⁷⁴³. En parallèle, des travaux montrent que CD103 qui est exprimé par les TIL CD8, est impliqué dans la rétention des LT au niveau du site de la tumeur mais aussi associé à la reconnaissance de la tumeur^{322,744}. Une autre étude montre que l'ectonucléotidase CD39 est exprimée dans une sous-population de LT CD8 CD103⁺ enrichie pour la spécificité aux tumeurs⁵³⁷.

En accord avec ces études, nous avons montré que dans la population de TIL CD8, l'expression des marqueurs de Trm et de CD39 sont induits le long de l'acquisition séquentielle des PCI et qu'ils ont une expression élevée dans les LT spécifiques de l'Ag tumoral. Nous avons également montré à l'aide des analyses scRNAseq, que les TIL CD8 épuisés présentent une expression faible du récepteur S1PR1 et plus élevée du récepteur de chimiokine CXCR6, ce qui est en cohérence avec leur rétention *in situ*. S1PR1 est impliqué dans la sortie des LT des LN pour regagner la circulation. CXCR6 est exprimé dans les cellules Trm du foie⁷⁴⁵, et son ligand, CXCL16, peut être produit sous des formes solubles ou liées à la membrane plasmique⁷⁴⁶. CXCL16 qui est exprimé par des cellules tumorales de différents types histologiques et par les CPA, est associé à une infiltration accrue par des LT⁷⁴⁷. Nous proposons que l'expression

de CXCR6 dans les TIL CD8 Trm épuisés et spécifiques de la tumeur facilite leur migration et leur interaction avec les cellules tumorales pour exercer leur fonctions effectrices tueuses et avec les CPA pour leur stimulation *in situ*.

Parmi les marqueurs Trm, les TIL CD4 Tconv épuisés n'expriment que CD69 mais expriment CXCR6 et présentent une faible expression de S1PR1. L'expression de CXCR6 suggère une interaction accrue des TIL CD4 PD-1^{hi}CD39⁺ avec les CPA et la combinaison CD69⁺CXCR6⁺S1PR1^{low} pourrait être indicative de leur résidence dans la tumeur. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser des AcM bloquant le CXCR6 dans nos expériences de co-cultures des TIL CD4 et DC et vérifier si la maturation des DC est affectée.

7. Activité anti-tumorale persistante des TIL épuisés

Comme l'épuisement est associé à la spécificité tumorale, il est supposé que les TIL épuisés ont, en revanche, acquis un fort potentiel anti-tumoral.

Dans nos expériences de stimulation *in vitro*, nous avons montré que le TGF- β , impliqué dans l'induction de CD103³²⁰ ainsi que dans l'expression élevée de PD-1⁴⁰⁷, pourrait également être impliqué dans la perte de la molécule de co-stimulation CD28, en combinaison avec une stimulation chronique. En effet, dans la tumeur, seulement les TIL CD8 épuisés spécifiques de la tumeur perdent l'expression de CD28. A notre connaissance, cette fonction n'a pas encore été attribuée au TGF- β , bien qu'elle soit cohérente avec son rôle immunosuppresseur. D'autre part, il a été démontré que le TGF- β induit l'expression de Sox4^{241,748}, qui intervient dans la production du chimio-attractant CXCL13 par les LT CD4. CXCL13 a été impliqué dans l'induction des TLS dans les maladies inflammatoires. De façon frappante, plusieurs études chez l'Homme ont montré que les TIL CD8 épuisés présentent une expression élevée de CXCL13^{546,733}. Une étude récente dans le cancer du sein montre que l'expression de l'ARNm de CXCL13 s'accompagne d'une sécrétion constitutive de la protéine correspondante⁷⁴⁹. En outre, son expression par les LT CD8 infiltrant les tumeurs s'associe à un recrutement élevé de LB et à la formation de TLS^{740,750}.

Nos résultats, en accord avec les données de la littérature, indiquent une expression accrue de Sox4 et de CXCL13 dans la population de TIL CD8 épuisés spécifiques de la tumeur et confirment l'implication du TGF- β dans son développement *in situ*. Les

TIL CD4 PD-1^{hi}CD39⁺ partagent plusieurs caractéristiques avec les LT CD8 épuisées, y compris l'expression de Sox4 et CXCL13. Ces résultats impliquent que les TIL CD8 et CD4 épuisés pourraient contribuer au recrutement des LB et à la formation des TLS dans le TME. Nous avons recherché les TLS dans les tumeurs de la cohorte de patients atteints de VADS et traités par anti-PD-1/PD-L1 dans notre étude sur l'épuisement des LT CD8. Cependant, la petite taille des biopsies et leur proximité, pour certains, des amygdales n'ont pas permis l'identification certaines des TLS.

Dans la population de TIL CD4 épuisés, l'expression de marqueurs d'activation tels que IL2RA, HLA-DMA et HLA-DGA1, indiquant une stimulation et une prolifération *in situ*, ainsi que la résidence tumorale sont compatibles avec l'accumulation de LT CD4 spécifiques de la tumeur dans le TME où ils se trouvent à des fréquences plus élevées qu'en périphérie⁷⁵¹. De plus, l'expression des protéines impliquées dans les voies métaboliques comme ACP5, RDH10, GK, SLC1A4 et CPM et l'absence de marqueurs de différenciation précoce sont en accord avec la stimulation chronique des CD4 TIL épuisés sur le site de la tumeur. Ces données suggèrent que les TIL CD4 épuisés ont néanmoins un potentiel effecteur élevé.

Dans la population de TIL CD8 épuisés, les fonctions effectrices des LT au stade d'épuisement précoce et tardif sont différentes. En effet, même au sein du compartiment dysfonctionnel, les LT CD8 jouent des rôles distincts dans l'immunité anti-tumorale. Les LT pré-épuisés et précoces sont capables de proliférer contrairement aux tardifs⁵⁷³. D'autre part, nos données montrent que les TIL CD8 au stade d'épuisement tardif ont une capacité de sécrétion des cytokines réduite mais l'expression de la perforine et des granzymes reste élevée au niveau transcriptionnel et protéique. Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux⁷⁴⁰.

En conclusion, ces données montrent clairement que les TIL CD8 et CD4 épuisés ne doivent pas être considérées comme inertes mais plutôt comme des LT ayant de nouvelles fonctionnalités. Néanmoins, la plupart des fonctions connues des LT, comme la sécrétion de cytokines, sont bloquées. Il est nécessaire de vérifier si l'immunothérapie peut contrer leur épuisement *in vivo*.

8. Rôle des LT CD4 dans la tumeur

Les LT CD4 jouent un rôle important dans le contrôle des tumeurs, soit en favorisant soit en inhibant les réponses anti-tumorales²⁰⁷. Il a été montré que les LT CD4 Tconv peuvent favoriser le contrôle des tumeurs en stimulant les LT CD8, les NK et d'autres

types de cellules immunitaires innées⁷⁵². Les Tconv peuvent également exercer des fonctions cytotoxiques directes. En effet, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les Th1 infiltrant la tumeur entraîne l'inhibition de la croissance tumorale⁷⁵³. Cependant, les mécanismes d'action exacts de l'activité effectrice anti-tumorale des LT CD4 ainsi que leur profil d'épuisement au site de la tumeur, sont peu étudiés.

Plusieurs études associent les TIL CD4 épuisés à des Tfh. Des travaux montrent que les TIL CD4 épuisés produisent de l'IL-10 et/ou de l'IL-21 et suggèrent une différenciation des Th1 vers un type cellulaire Tfh, induite par la signalisation chronique IFN α / β ⁴⁶³. Cependant, ces travaux sont réalisés dans des modèles d'infection virale chronique. Chez l'homme, une population de LT CD4 de type Tfh caractérisée par l'expression de BCL-6 et CXCL13 a été identifiée dans plusieurs types de tumeurs⁷⁵⁴. Nos résultats suggèrent que les TIL CD4 Tconv épuisés se distinguent des cellules Tfh. Les Tfh sont principalement définis par l'expression de BCL-6, CXCL13 et CXCR5. Bien que les TIL Tconv épuisés expriment CXCL13, l'analyse d'expression différentielle des gènes entre les populations de TIL Tconv CD39⁺ et CD39⁻ à partir des données scRNAseq montre que les gènes BCL-6 et CXCR5 ne sont pas différemment exprimés entre ces deux populations.

D'autre part, il est bien connu que les Treg infiltrant la tumeur expriment des niveaux élevés de CD39 et CTLA-4⁷⁵⁵ et neutralisent les réponses immunitaires spécifiques de la tumeur en supprimant l'infiltration et l'activité anti-tumorale des LT CD8 et des macrophages. Les TIL Tconv épuisés expriment également CD39 et CTLA-4, cependant cette population est distincte des Treg. En effet, nous avons étudié les TIL CD4 qui n'expriment pas le facteur de transcription caractéristique des Treg, FOXP3, et ces cellules sécrètent des cytokines principalement associées à un profil Th1. Une étude qui renforce cette hypothèse montre que les tumeurs contiennent deux populations de LT CD4 CD39⁺⁷⁴¹. L'une exprime des marqueurs de Treg, tandis que l'autre présente un profil non régulateur et Trm, similaire à celui de la population de TIL CD8 épuisée. Cette population de Tconv CD39⁺ épuisée est enrichie en LT spécifiques à la tumeur. En accord avec ces résultats, des données de scRNAseq, obtenus à partir de tumeurs de patients, ont décrit des profils bien distincts de TIL CD4, notamment les LT CD4 épuisés, les LT CD4 naïfs et mémoires, les LT CD4 effecteurs cytotoxiques, les Treg et les Tfh^{573,733}. Les TIL Tconv étudiés ici semblent présenter un profil Th1 épuisé, distinct des Tfh et Treg.

9. Rôle du CD39 dans les TIL épuisés

CD39 est une ectonucléotidase qui régule les niveaux extracellulaires d'ATP et d'Ado, en collaboration avec l'ectonucléotidase CD73. L'ATP est impliqué dans l'activation des DC et macrophages, inhibe la prolifération des cellules tumorales et induit la destruction de celles-ci. L'activité de CD39 et CD73 permet de consommer l'ATP extracellulaire et de générer de l'ADP, de l'AMP puis de l'Ado qui est toxique pour les LT⁵⁴⁰. Une augmentation de l'expression de CD39 et CD73 est associée à un TME immunosuppresseur. En lien avec ces données, nous trouvons que les TIL CD8 et CD4 épuisés spécifiques de la tumeur et les TIL $\gamma\delta$ expriment CD39. En effet, il a été montré que la stimulation chronique du TCR dans le TME, en présence de certaines cytokines par exemple TGF- β , IL-6 et IL-27, entraînent l'expression de CD39 dans les LT^{537,756}.

CD39 peut contrebalancer la réponse immunitaire en cours dans les tumeurs en supprimant la prolifération et les fonctions effectrices des LT^{542,757}. Le blocage de CD39, lors d'une stimulation de PBMC *in vitro*, a stimulé leur trafic, leur prolifération et la production d'IFN- γ ⁵⁴². CD39 joue aussi un rôle dans la rétention des LT dans le TME. L'ATP extracellulaire permet le trafic des cellules immunitaires qui est bloqué par l'Ado⁷⁵⁸. Par conséquent, les LT sont maintenus efficacement dans le TME immunosuppresseur. Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent que les TIL CD8 et Tconv épuisés CD39⁺ présentent des caractéristiques associés à la résidence tissulaire.

Nous avons identifié CD39 comme marqueur des TIL Tconv épuisés qui sécrètent de plus faibles quantités de cytokines en comparaison aux autres Tconv infiltrant la tumeur. La consommation d'ATP par le CD39 exprimé par les LT CD4 épuisés pourrait contribuer, en plus de leur épuisement, à réduire leur activité auxiliaire vis-à-vis des DC qui sont moins stimulés par manque d'ATP. Il serait intéressant d'évaluer cette hypothèse en utilisant des AcM anti-CD39 bloquants. Cependant, CD39 étant également exprimé par les DC, il serait utile de pré-incuber les TIL CD4 avec les anti-CD39 puis de les intégrer dans des systèmes de co-culture, comme ceux que nous avons utilisé ici avec les DC et/ou les LT CD8, afin d'évaluer la contribution spécifique de CD39 exprimé par les LT CD4 à la modulation des concentrations d'ATP.

Nos résultats montrent que les TIL Tconv CD39⁺ n'expriment pas CD73, ce qui est en accord avec les travaux précédents qui ne montrent aucune co-expression de CD39

et CD73 dans les TIL chez l'Homme⁵⁴⁰. Par conséquent, CD39 ne semble pas être directement impliqué dans l'épuisement des TIL CD4, médié par l'Ado, de manière intrinsèque à la cellule. Cependant, l'expression de CD39 par les TIL CD4 épuisés pourrait contribuer à la production d'Ado dans le TME, où CD73 est exprimé à la fois par d'autres cellules immunitaires et par les cellules tumorales.

Nous proposons un modèle dans lequel CD39 n'inhibe pas directement les LT CD8 ou Tconv sur lesquels il est exprimé mais participe plutôt activement à la mise en place du TME immunosuppresseur en diminuant la disponibilité en ATP et en augmentant l'Ado du milieu extracellulaire. Une étude montre que le blocage des deux enzymes CD39 et CD73 permet de retrouver l'activité effectrice anti-tumorale des LT et NK⁵⁴⁰. Une autre étude a montré qu'un mécanisme d'action du blocage de CD39 permet la liaison de l'ATP à un récepteur purinergique P2 qui est co-exprimé avec CD39 sur les cellules myéloïdes et induit la sécrétion d'IL-18 qui augmente les fonctions effectrices des TIL⁵⁴².

10. Mécanismes d'action des anticorps anti-PD-1

Nos résultats montrent que les LT CD8 spécifiques des Ag tumoraux circulants sont des LT mémoires CD28⁺. Ces cellules, tout comme les LT CD8 PD-1⁺ mémoires non épuisés de donneurs sains présents en périphérie⁷⁵⁹, expriment PD-1 à des niveaux plus faibles que leurs homologues qui infiltrent la tumeur. En conséquence, les LT CD8 circulants spécifiques de la tumeur qui n'expriment pas les marqueurs d'épuisement, prolifèrent lors d'une stimulation *in vitro* antigénique, et celle-ci est augmentée en présence d'AcM anti-PD-1.

Il a été montré que lorsque PD-1 est engagé avec son ligand, il recrute la protéine SHP2 dans sa partie intracellulaire qui déphosphoryle les protéines impliquées dans la signalisation par le complexe TCR. Ceci implique un rôle central de PD-1 dans le blocage des fonctions effectrices des LT⁴⁷⁶. Des études montrent que la signalisation de PD-1 inhibe plus efficacement la molécule CD28 que les molécules de signalisation du complexe TCR⁴⁸⁶. Une étude montre que la prolifération des LT CD8 PD-1⁺CD28⁺ en périphérie est associée à la réponse au blocage des PCI chez les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules⁴⁸⁷.

Nous avons montré une perte significative de l'expression de CD28 dans les TIL CD8 spécifiques des Ag tumoraux épuisés. Cependant, les LT circulants spécifiques de la tumeur sont, pour la plupart, CD28⁺. Nos analyses fonctionnelles ont montré que

l'inhibition de PD-1 *in vitro* module différemment la prolifération et les fonctions effectrices des LT spécifiques des Ag tumoraux selon s'il proviennent du TME ou de la périphérie. Ces résultats sont en accord avec les travaux décrits précédemment et impliquent qu'une faible expression de PD-1 dans les LT spécifiques de la tumeur circulants affecte de préférence la signalisation de CD28, alors que la surexpression de PD-1 dans les TIL Trm épuisés permet l'inhibition de la signalisation TCR en plus de celle de CD28. Il est à noter que, dans un système de reconstitution biochimique *in vitro*, la déphosphorylation de CD28 par la signalisation sous le PD-1, se produit à de faibles densités de PD-1, alors que la déphosphorylation des molécules de la signalisation du complexe TCR nécessite une densité plus élevée de molécules PD-1⁴⁸⁶. Ces données sont en accord avec nos données montrant une augmentation de la sécrétion de cytokines retrouvée suite au blocage *in vitro* du PD-1 dans les TIL CD8 épuisés qui expriment des niveaux élevés de cette molécule.

Les TIL Tconv ont été identifiés comme essentiels pour l'efficacité du blocage de l'axe PD-1/PDL-1 *in vivo* chez la souris⁷³¹. Cependant Les mécanismes d'action des anti-PD1 sur la population de TIL CD4 Tconv sont très peu connus. Nos résultats indiquent que les TIL CD4 expriment des niveaux élevés de PD-1. Nos expériences *in vitro* montrent qu'en présence d'anti-PD-1 la sécrétion de cytokines et l'expression de la molécule de co-stimulation CD40L par les TIL CD4 sont augmentées. Ceci suggère que PD-1 inhibe la signalisation TCR dans cette population. Contrairement aux TIL CD8 épuisés, les TIL CD4 ne perdent pas la molécule CD28, il reste à déterminer si le blocage de PD-1 augmente également la prolifération des TIL CD4 spécifiques des Ag tumoraux. Le blocage de CTLA-4, qui a démontré un rôle dans l'expansion d'un sous-ensemble de LT CD4 effecteurs, soutient cette hypothèse⁶⁷⁶.

11. Population cible des anticorps anti-PD-1

Plusieurs travaux montrent que les LT CD8 au stade pré-épuisé ou d'épuisement précoce caractérisés par l'expression de TCF1, prolifèrent dans la tumeur en réponse au blocage de PD-1 et sont les principaux acteurs de la réponse à cette thérapie^{568,576–578}. Cependant, ces études reposent largement sur des modèles murins où le degré d'épuisement n'est pas nécessairement comparable à celui constaté chez les patients. Une étude montre que la proportion de cellules TCF1⁺ n'est pas corrélée avec la réponse au traitement, mais qu'elle est corrélée avec la survie chez les patients qui répondent au traitement uniquement⁵⁶⁸. Une autre étude a montré que le rapport entre

les cellules TCF1⁺ et TCF1⁻, plutôt que la proportion de cellules positives, est corrélé aux réponses cliniques⁵⁷⁷.

Dans notre étude, l'ARNm *TCF7* et la protéine TCF1 n'ont été détectés que dans des cellules non QP au niveau du site de la tumeur. Nos marquages tétramères CMH-I/peptide des TIL CD8 montrent que les LT spécifiques de l'Ag tumoral sont pour la plupart QP, une faible proportion est TP (moyenne 12,6%) ou DP (moyenne 6,5%). D'autre part, la proportion moyenne de TIL CD8 TCF1⁺ est de 23% parmi les TIL DP, 10% parmi les TIL TP et 5% parmi les TIL QP. Ces résultats impliquent qu'une très faible proportion de TIL spécifiques de la tumeur exprime TCF1. D'autre part, les LT CD8 spécifiques de la tumeur qui renouvellent les LT du TME sont des LT provenant de la périphérie, nous montrons qu'ils sont DP. Une étude montre que parmi ces LT spécifiques de la tumeur en périphérie chez les patients, moins de 1% sont TCF1⁺⁵⁷⁸. Nous suggérons que les LT CD8 DP qui arrivent au site de la tumeur évoluent vers un stade épuisé tardif sans nécessairement exprimer TCF1 au préalable. Ce marqueur précoce semble plutôt être un marqueur spécifique des cellules épuisées précoces chez la souris. Dans ce contexte, nous montrons que les AcM anti-PD-1 *in vitro* augmentent les fonctions effectrices des TIL spécifiques de la tumeur au stade d'épuisement tardif QP pour la plupart et améliorent la prolifération des LT CD8 spécifiques de la tumeur DP présents en périphérie.

Les LT CD8 spécifiques de la tumeur expriment plusieurs RI. Les travaux futurs devraient permettre de déterminer si le ciblage de l'un des nombreux autres RI connus ou potentiels, seul ou en combinaison, sur ces cellules peut encore accroître leur activité. Ceci représente une perspective particulièrement intéressante compte tenu des potentiels cytotoxique et effecteur élevés de cette population.

De manière importante, en accord avec leur spécificité tumorale et leur potentiel cytotoxique et effecteur élevé, nous montrons que les TIL CD8 de type Trm au stade d'épuisement tardif TCF1⁻TIM-3⁺ sont prédictifs de la réponse au blocage de l'axe PD-1/PD-L1 et de la survie dans une cohorte de patients atteints de cancer des VADS. Il est à noter que ces résultats n'excluent pas un rôle potentiellement important des TIL CD8 TCF1⁺ spécifiques de la tumeur dans la réponse à la thérapie.

Dans de futurs projets, il serait important d'associer l'infiltration des TIL CD8 TIM-3⁺ avec la réponse au blocage de l'axe PD-1/PD-L1 et la survie des patients dans plusieurs types de tumeurs. Ceci permettrait de valider l'expression de TIM-3 par le LT CD8 comme marqueur prédictif de la réponse à l'immunothérapie du cancer dans des

essais prospectifs plus importants et dans d'autres types de tumeur. De plus, il serait intéressant de comparer la proportion de ces TIL CD8 spécifiques de la tumeur retrouvée dans les cancers des VADS avec celle des types tumoraux identifiés comme « bons répondeurs » au blocage de l'axe PD-1/PD-L1. Nous suggérons que les types tumoraux qui répondent efficacement à l'inhibition de PD-1 ont une proportion plus élevée de TIL CD8 TIM-3⁺. Il a été montré que les cancers des VADS induits par le virus HPV répondent mieux au blocage de PD-1/PD-L1⁷¹². Dans notre cohorte de patients atteints de cancer des VADS, nous trouvons une différence significativement plus importante entre la survie des patients du groupe TIM-3^{hi} et celle du groupe TIM-3^{low} chez les patients HPV⁺ en comparaison aux HPV⁻. Ces résultats sont préliminaires et ne représentent qu'une faible proportion de patients dans chaque groupe, le nombre de patient est à élargir pour vérifier cette hypothèse.

En accord avec nos résultats, une analyse rétrospective de l'infiltration de TIL CD8 PD-1^{hi} dans des biopsies de patients atteints de cancer du poumon qui ont été traités avec des anti-PD-1 a révélé une corrélation positive entre la fréquence de ces cellules et la réponse au traitement et la survie des patients⁷⁴⁰. Il est à noter qu'un article récent a montré dans un modèle murin que la conversion d'un état d'épuisement précoce TCF1⁺ des TIL CD8 en un état d'épuisement tardif TIM-3⁺ contribue à la réponse au blocage des PCI⁷⁶⁰. En effet, la croissance de la tumeur a été considérablement réduite lors du traitement anti-PD1 lorsque l'expression de la phosphatase Ptpn2, qui inhibe la transition vers l'épuisement tardif, a été supprimée.

Nous pensons que la présence de TIL CD8 TIM-3⁺ est un indicateur direct, ou même un biomarqueur, d'une réponse adaptative spontanée à la tumeur qui peut être mobilisée par le blocage de PD-1. En conclusion, nos résultats impliquent que la combinaison de la prolifération des LT CD8 mémoires circulants, qui vont infiltrer le site de la tumeur, combinée à la réversion de l'épuisement, même temporaire⁷⁶¹, au site de la tumeur, est un mécanisme induisant le contrôle de la tumeur médié par les anti-PD-1. En accord avec nos résultats, une étude récente montre que la réponse des LT au blocage des PCI provient de l'expansion de clones de LT spécifiques des Ag tumoraux distincts de ceux trouvés dans le TME avant thérapie, qui peuvent être entrés dans la tumeur suite au traitement⁷⁶².

L'accumulation de TIL CD4 spécifiques de la tumeur au niveau du TME indique qu'ils jouent des fonctions effectrices par le biais, par exemple, de la sécrétion d'IFN- γ ²⁰⁷. Des travaux ont montré que la présence de LT CD4 spécifiques de néoAg, était

nécessaire à la régression tumorale après une immunothérapie par blocage de l'axe PD-1/PD-L1⁷³¹. Ceci suggère que les anti-PD-1 ciblent directement les TIL CD4 PD-1⁺. En revanche, les mécanismes d'action du blocage de PD-1 sur la population de TIL CD4 sont inconnus. Nos résultats montrent que le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 sur les TIL CD4 a augmenté leur activation identifiée par une augmentation de l'expression du CD40L. De plus, leurs fonctions auxiliaires ont également été améliorées comme en témoigne la maturation accrue des DC, qui a conduit à une augmentation de l'expression de CD86 et de la sécrétion d'IL-12. Dans le modèle de l'Ag tumoral NY-ESO-1, nous avons montré que le blocage de PD-1 dans les TIL CD4 entraîne une prolifération des LT CD8 autologues spécifiques de NY-ESO-1. Ceci est en accord avec la nécessité d'un dialogue entre les LT CD8 et les DC impliquant la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ pour la réponse à l'immunothérapie⁷³². Les résultats obtenus dans le modèle NY-ESO-1, dans lequel les LT CD4 spécifiques sont PD-1^{hi}CD39⁺, démontrent que le blocage de PD-1 peut restaurer les fonctions d'aide de cette population au stade d'épuisement tardif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
4. Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346–354 (2013).
5. Egeblad, M., Nakasone, E. S. & Werb, Z. Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Dev. Cell* **18**, 884–901 (2010).
6. Sanderson, R. J. Squamous cell carcinomas of the head and neck * Commentary: Head and neck carcinomas in the developing world. *BMJ* **325**, 822–827 (2002).
7. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 269–282 (2018).
8. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 60–72 (2020).
9. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
10. Mourad, M. *et al.* Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States: A SEER Population Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **75**, 2562–2572 (2017).
11. Fitzmaurice, C. *et al.* Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **3**, 524–548 (2017).
12. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F. & Fakhry, C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3235–3242 (2015).
13. Mehanna, H. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* **35**, 747–755 (2013).
14. Chaturvedi, A. K. *et al.* Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4294–4301 (2011).
15. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 93–99 (2017).
16. Lydiatt, W. M. *et al.* Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 122–137 (2017).
17. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition | Wiley. *Wiley.com*
<https://www.wiley.com/en-us/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263579>.
18. Pfister, D. G. *et al.* Head and Neck Cancers, Version 2.2014. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **12**, 1454–1487 (2014).
19. Braakhuis, B. J. M., Brakenhoff, R. H. & Leemans, C. R. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23 Suppl 10**, x173–177 (2012).
20. Adelstein, D. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 2.2017. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **15**, 761–770 (2017).
21. Pignon, J.-P., Maître, A. le, Maillard, E. & Bourhis, J. Meta-analysis of chemotherapy

- in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother. Oncol.* **92**, 4–14 (2009).
22. Adelstein, D. J. *et al.* An Intergroup Phase III Comparison of Standard Radiation Therapy and Two Schedules of Concurrent Chemoradiotherapy in Patients With Unresectable Squamous Cell Head and Neck Cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 92–98 (2003).
 23. Slatnik, C. L. P. & Duff, E. Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *Nurse Pract.* **40**, 47–54 (2015).
 24. Cancer of the Ovary - Cancer Stat Facts. *SEER*
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>.
 25. Chien, J. & Poole, E. M. Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. *Int. J. Gynecol. Cancer* **27**, (2017).
 26. Carlson, K. J., Skates, S. J. & Singer, D. E. Screening for Ovarian Cancer. *Ann. Intern. Med.* **121**, 124–132 (1994).
 27. Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. & Ledermann, J. A. Ovarian cancer. *The Lancet* **384**, 1376–1388 (2014).
 28. Vargas, A. N. Natural history of ovarian cancer. *ecancermedicalscience* **8**, (2014).
 29. Mallen, A. *et al.* Surgical prevention strategies in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **151**, 166–175 (2018).
 30. Tschernichovsky, R. & Goodman, A. Risk-Reducing Strategies for Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: A Balancing Act. *The Oncologist* **22**, 450–459 (2017).
 31. Walker, J. L. *et al.* Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer* **121**, 2108–2120 (2015).
 32. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *The Lancet* **385**, 1835–1842 (2015).
 33. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis including 28 114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* **13**, 946–956 (2012).
 34. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. *PLoS Med.* **9**, e1001200 (2012).
 35. Finch, A. P. M. *et al.* Impact of Oophorectomy on Cancer Incidence and Mortality in Women With a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *J. Clin. Oncol.* **32**, 1547–1553 (2014).
 36. Stewart, C., Ralyea, C. & Lockwood, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **35**, 151–156 (2019).
 37. National Academies of Sciences, E. *Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care*. (2016). doi:10.17226/21841.
 38. Javadi, S., Ganeshan, D. M., Qayyum, A., Iyer, R. B. & Bhosale, P. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. *Am. J. Roentgenol.* **206**, 1351–1360 (2016).
 39. Mutch, D. G. & Prat, J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* **133**, 401–404 (2014).
 40. Using PARP Inhibitors in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Network*
<https://www.cancernetwork.com/view/using-parp-inhibitors-advanced-ovarian-cancer>.
 41. Wright, A. A. *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed, Advanced Ovarian Cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3460–3473 (2016).
 42. Wright, A. A. *et al.* Use and Effectiveness of Intraperitoneal Chemotherapy for Treatment of Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 2841–2847

(2015).

43. Hennessy, B. T., Coleman, R. L. & Markman, M. Ovarian cancer. *The Lancet* **374**, 1371–1382 (2009).
44. Luvero, D., Milani, A. & Ledermann, J. A. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential: *Ther. Adv. Med. Oncol.* (2014) doi:10.1177/1758834014544121.
45. Esselen, K. M. *et al.* Use of CA-125 Tests and Computed Tomographic Scans for Surveillance in Ovarian Cancer. *JAMA Oncol.* **2**, 1427 (2016).
46. Al Rawahi, T. *et al.* Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**, (2013).
47. Lorusso, D., Mancini, M., Di Rocco, R., Fontanelli, R. & Raspagliesi, F. The Role of Secondary Surgery in Recurrent Ovarian Cancer. *Int. J. Surg. Oncol.* **2012**, 1–6 (2012).
48. Pötter, R. *et al.* Clinical outcome of protocol based image (MRI) guided adaptive brachytherapy combined with 3D conformal radiotherapy with or without chemotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Radiother. Oncol.* **100**, 116–123 (2011).
49. Sturdza, A. *et al.* Image guided brachytherapy in locally advanced cervical cancer: Improved pelvic control and survival in RetroEMBRACE, a multicenter cohort study. *Radiother. Oncol.* **120**, 428–433 (2016).
50. Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A. & Denny, L. Cervical cancer. *The Lancet* **393**, 169–182 (2019).
51. Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. & Gissmann, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24**, S1–S10 (2006).
52. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S. & Kitchener, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* **382**, 889–899 (2013).
53. Group, T. F. I. S. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa061741> https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa061741?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed (2009) doi:10.1056/NEJMoa061741.
54. Paavonen, J. *et al.* Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet* **374**, 301–314 (2009).
55. Dobson, S. R. M. *et al.* Immunogenicity of 2 Doses of HPV Vaccine in Younger Adolescents vs 3 Doses in Young Women: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **309**, 1793–1802 (2013).
56. Joura, E. A. *et al.* A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa1405044> https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa1405044?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed (2015) doi:10.1056/NEJMoa1405044.
57. Damme, P. V. *et al.* Immunogenicity and Safety of a 9-Valent HPV Vaccine. *Pediatrics* **136**, e28–e39 (2015).
58. Koh, W.-J. *et al.* Cervical Cancer, Version 2.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **13**, 395–404 (2015).
59. Tewari, K. S. & Monk, B. J. Evidence-Based Treatment Paradigms for Management of Invasive Cervical Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **37**, 2472–2489 (2019).
60. Monk, B. J., Tewari, K. S. & Koh, W.-J. Multimodality Therapy for Locally

Advanced Cervical Carcinoma: State of the Art and Future Directions. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2952–2965 (2007).

61. Cann, S. A. H., Netten, J. P. van & Netten, C. van. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad. Med. J.* **79**, 672–680 (2003).
62. McCarthy, E. F. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop. J.* **26**, 154–158 (2006).
63. Burnet, M. Cancer—A Biological Approach. *Br. Med. J.* **1**, 779–786 (1957).
64. Stutman, O. Spontaneous tumors in nude mice: effect of the viable yellow gene. *Exp. Cell Biol.* **47**, 129–135 (1979).
65. Stutman, O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 353–358 (1979).
66. Stutman, O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* **183**, 534–536 (1974).
67. Hunig, T. T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol. Today* **4**, 84–87 (1983).
68. Maleckar, J. R. & Sherman, L. A. The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **138**, 3873–3876 (1987).
69. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
70. MacKie, R. M., Reid, R. & Junor, B. Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJM200302063480620> (2009) doi:10.1056/NEJM200302063480620.
71. Vajdic, C. M. *et al.* Cancer Incidence Before and After Kidney Transplantation. *JAMA* **296**, 2823–2831 (2006).
72. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* **370**, 59–67 (2007).
73. Bruggen, P. van der *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–1647 (1991).
74. Sharma, P. *et al.* CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 3967–3972 (2007).
75. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18538–18543 (2005).
76. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
77. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The Immune System. *N. Engl. J. Med.* **343**, 37–49 (2000).
78. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate Immune Induction of the Adaptive Immune Response. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 429–436 (1999).
79. Vivier, E. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**, 1054–1066 (2018).
80. Pradeu, T., Jaeger, S. & Vivier, E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 764–769 (2013).
81. Demaria, O. *et al.* Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* **574**, 45–56 (2019).
82. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
83. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* **391**, 2128–2139

(2018).

84. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
85. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
86. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2011).
87. Broz, M. L. *et al.* Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638–652 (2014).
88. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M. & Kastenmüller, W. CD4 + T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 635–647 (2018).
89. Jäger, E. *et al.* Simultaneous Humoral and Cellular Immune Response against Cancer–Testis Antigen NY-ESO-1: Definition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-A2-binding Peptide Epitopes. *J. Exp. Med.* **187**, 265–270 (1998).
90. Old, L. J. Cancer Immunology: The Search for Specificity—G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* **41**, 361–375 (1981).
91. Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11810–11813 (1995).
92. Germain, C. *et al.* Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 832–844 (2014).
93. Motz, G. T. & Coukos, G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* **39**, 61–73 (2013).
94. Plaen, E. D. *et al.* Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 2274–2278 (1988).
95. Stauss, H. J., Van Waes, C., Fink, M. A., Starr, B. & Schreiber, H. Identification of a unique tumor antigen as rejection antigen by molecular cloning and gene transfer. *J. Exp. Med.* **164**, 1516–1530 (1986).
96. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146 (2014).
97. Hérin, M. *et al.* Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int. J. Cancer* **39**, 390–396 (1987).
98. Eynde, B. D. V. *et al.* Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL. *Int. J. Cancer* **44**, 634–640 (1989).
99. Smith, H. A. & McNeel, D. G. The SSX Family of Cancer-Testis Antigens as Target Proteins for Tumor Therapy. *Clinical and Developmental Immunology* vol. 2010 e150591 <https://www.hindawi.com/journals/jir/2010/150591/> (2010).
100. Chen, Y.-T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 1914–1918 (1997).
101. Cox, A. L. *et al.* Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**, 716–719 (1994).
102. Parker, K. C. & Coligan, J. E. Scheme for Ranking Potential HLA-A2 Binding Peptides Based on Independent Binding of Individual Peptide Side-Chains. *J. Immunol.* **13**.
103. Bruggen, P. van der *et al.* A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3038–3043 (1994).
104. Bruggen, P. V. D. *et al.* Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by

- human T cells. *Immunol. Rev.* **188**, 51–64 (2002).
105. Gambacorti-Passerini, C. *et al.* Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **81**, 1369–1375 (1993).
106. Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., Melief, C. J. & Leeksa, O. C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* **88**, 3522–3527 (1996).
107. Tsang, K. Y. *et al.* Generation of Human Cytotoxic T Cells Specific for Human Carcinoembryonic Antigen Epitopes From Patients Immunized With Recombinant Vaccinia-CEA Vaccine. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 982–990 (1995).
108. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun.* **13**, (2013).
109. Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V. & Szikora, J.-P. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. 8.
110. Schmitz, M. *et al.* Generation of Survivin-specific CD8+ T Effector Cells by Dendritic Cells Pulsed with Protein or Selected Peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845–4849 (2000).
111. Schmidt, S. M. *et al.* Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* **102**, 571–576 (2003).
112. Röpke, M. *et al.* Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 14704–14707 (1996).
113. Barfoed *et al.* Cytotoxic T-Lymphocyte Clones, Established by Stimulation with the HLA-A2 Binding p5365–73 Wild Type Peptide Loaded on Dendritic Cells In Vitro, Specifically Recognize and Lyse HLA-A2 Tumour Cells Overexpressing the p53 Protein. *Scand. J. Immunol.* **51**, 128–133 (2000).
114. Kraus, M. H., Popescu, N. C., Amsbaugh, S. C. & King, C. R. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J.* **6**, 605–610 (1987).
115. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).
116. Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T. & Ioannides, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* **181**, 2109–2117 (1995).
117. Inoue, K. *et al.* Aberrant Overexpression of the Wilms Tumor Gene (WT1) in Human Leukemia. *Blood* **89**, 1405–1412 (1997).
118. Cilloni, D. *et al.* Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115–2121 (2002).
119. Chapuis, A. G. *et al.* Transferred WT1-Reactive CD8+ T Cells Can Mediate Antileukemic Activity and Persist in Post-Transplant Patients. *Sci. Transl. Med.* **5**, 174ra27–174ra27 (2013).
120. Berset, M. *et al.* Expression of melan-a/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* **95**, 73–77 (2001).
121. Hoek, K. S. *et al.* Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 665–676 (2008).
122. Ayyoub, M. *et al.* Activation of Human Melanoma Reactive CD8+ T Cells by Vaccination with an Immunogenic Peptide Analog Derived from Melan-A/Melanoma Antigen Recognized by T Cells-1. *Clin. Cancer Res.* **9**, 669–677 (2003).

123. Brichard, V. *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**, 489–495 (1993).
124. Wölfel, T. *et al.* Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 759–764 (1994).
125. Vigneron, N. *et al.* A peptide derived from melanocytic protein gp100 and presented by HLA-B35 is recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on melanoma cells. *Tissue Antigens* **65**, 156–162 (2005).
126. Kawakami, Y. *et al.* Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J. Immunol.* **154**, 3961–3968 (1995).
127. Zarour, H. *et al.* The Majority of Autologous Cytolytic T-Lymphocyte Clones Derived from Peripheral Blood Lymphocytes of a Melanoma Patient Recognize an Antigenic Peptide Derived from Gene Pmel17/gp100. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 63–67 (1996).
128. Coulie, P. G. *et al.* A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**, 35–42 (1994).
129. Kawakami, Y. *et al.* Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **180**, 347–352 (1994).
130. Wang, R. F., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J. Exp. Med.* **183**, 1131–1140 (1996).
131. Wang, R.-F., Appella, E., Kawakami, Y., Kang, X. & Rosenberg, S. A. Identification of TRP-2 as a Human Tumor Antigen Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 2207–2216 (1996).
132. Visseren, M. J. *et al.* CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy donor blood to lyse melanoma cells. *J. Immunol.* **154**, 3991–3998 (1995).
133. Pittet, M. J. *et al.* High Frequencies of Naive Melan-a/Mart-1-Specific Cd8+ T Cells in a Large Proportion of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (Hla)-A2 Individuals. *J. Exp. Med.* **190**, 705–716 (1999).
134. Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K. W., Hasan, M. & Albert, M. L. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* **115**, 3718–3725 (2010).
135. Hong, J. J. *et al.* Successful Treatment of Melanoma Brain Metastases with Adoptive Cell Therapy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4892–4898 (2010).
136. Olson, B. M. *et al.* HLA-A2-restricted T-cell epitopes specific for prostatic acid phosphatase. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 943–953 (2010).
137. Correale, P. *et al.* In Vitro Generation of Human Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Peptides Derived From Prostate-Specific Antigen. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 293–300 (1997).
138. Hammarström, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 67–81 (1999).
139. De Plaen, E. *et al.* Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360–369 (1994).
140. Fratta, E. *et al.* The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Oncol.* **5**, 164–182 (2011).
141. Almeida, L. G. *et al.* CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* **37**, D816–D819 (2009).
142. Lurquin, C. *et al.* Two Members of the HumanMAGEB Gene Family Located in Xp21.3 Are Expressed in Tumors of Various Histological Origins. *Genomics* **46**, 397–408

(1997).

143. Lucas, S. *et al.* Identification of a New MAGE Gene with Tumor-specific Expression by Representational Difference Analysis. *Cancer Res.* **58**, 743–752 (1998).
144. Chomez, P. *et al.* An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family. *Cancer Res.* **61**, 5544–5551 (2001).
145. Boël, P. *et al.* BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* **2**, 167–175 (1995).
146. Van den Eynde, B. *et al.* A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* **182**, 689–698 (1995).
147. Backer, O. D. *et al.* Characterization of the GAGE Genes That Are Expressed in Various Human Cancers and in Normal Testis. *Cancer Res.* **59**, 3157–3165 (1999).
148. Lethé, B. *et al.* LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* **76**, 903–908 (1998).
149. Türeci, Ö. *et al.* The SSX-2 Gene, Which Is Involved in the t(X;18) Translocation of Synovial Sarcomas, Codes for the Human Tumor Antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* **56**, 4766–4772 (1996).
150. Gure, A. O. *et al.* SSX: A multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer* **72**, 965–971 (1997).
151. Ochsenreither, S. *et al.* Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood* **119**, 5492–5501 (2012).
152. Thomas, R. *et al.* NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front. Immunol.* **9**, 947 (2018).
153. Ehrlich, M. *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2709–2721 (1982).
154. Weber, J. *et al.* Expression of the MAGE-1 Tumor Antigen Is Up-Regulated by the Demethylating Agent 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Res.* **54**, 1766–1771 (1994).
155. De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V. & Boon, T. DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7327–7335 (1999).
156. Sigalotti, L. *et al.* Intratumor Heterogeneity of Cancer/Testis Antigens Expression in Human Cutaneous Melanoma Is Methylation-Regulated and Functionally Reverted by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **64**, 9167–9171 (2004).
157. Morgan, R. A. *et al.* Cancer Regression and Neurological Toxicity Following Anti-MAGE-A3 TCR Gene Therapy. *J. Immunother.* **36**, 133–151 (2013).
158. Haas, G. G., D'Cruz, O. J. & De Bault, L. E. Distribution of Human Leukocyte Antigen-ABC and -D/DR Antigens in the Unfixed Human Testis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **18**, 47–51 (1988).
159. Hamai, A. *et al.* Antibody Responses to NY-ESO-1 in Primary Breast Cancer Identify a Subtype Target for Immunotherapy. *PLOS ONE* **6**, e21129 (2011).
160. Kisseleva-Romanova, E. *et al.* Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J.* **25**, 3576–3585 (2006).
161. Valmori, D. *et al.* Naturally Occurring Human Lymphocyte Antigen-A2 Restricted CD8+ T-Cell Response to the Cancer Testis Antigen NY-ESO-1 in Melanoma Patients. *Cancer Res.* **60**, 4499–4506 (2000).
162. Robbins, P. F. *et al.* Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.* **29**, 917–924 (2011).
163. Hunder, N. N. *et al.* Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4+ T

Cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2008).

164. Cheever, M. A. *et al.* The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5323–5337 (2009).

165. Valmori, D. *et al.* Epitope clustering in regions undergoing efficient proteasomal processing defines immunodominant CTL regions of a tumor antigen. *Clin. Immunol.* **122**, 163–172 (2007).

166. Valmori, D. *et al.* Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8947–8952 (2007).

167. Wolfel, T. *et al.* A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281–1284 (1995).

168. Tran, E. *et al.* T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2255–2262 (2016).

169. Kvistborg, P. *et al.* TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8+ T cell compartment in melanoma patients. *OncoImmunology* **1**, 409–418 (2012).

170. Yun, C. *et al.* Augmentation of immune response by altered peptide ligands of the antigenic peptide in a human CD4+ T-cell clone reacting to TEL/AML1 fusion protein. *Tissue Antigens* **54**, 153–161 (1999).

171. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214–218 (2013).

172. Lennerz, V. *et al.* The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 16013–16018 (2005).

173. Veatch, J. R. *et al.* Endogenous CD4+ T Cells Recognize Neoantigens in Lung Cancer Patients, Including Recurrent Oncogenic KRAS and ERBB2 (Her2) Driver Mutations. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 910–922 (2019).

174. Snyder, A. *et al.* Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2189–2199 (2014).

175. Gupta, S., Artomov, M., Goggins, W., Daly, M. & Tsao, H. Gender Disparity and Mutation Burden in Metastatic Melanoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).

176. Tran, E. *et al.* Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science* **344**, 641–645 (2014).

177. Schumacher, T. N., Scheper, W. & Kvistborg, P. Cancer Neoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 173–200 (2019).

178. Iacovides, D., Michael, S., Achilleos, C. & Strati, K. Shared mechanisms in stemness and carcinogenesis: lessons from oncogenic viruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, (2013).

179. van der Burg, S. H. & Melief, C. J. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 252–257 (2011).

180. Fujita, Y., Rooney, C. M. & Heslop, H. E. Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 193–198 (2008).

181. Ramos, J. C. & Lossos, I. S. Newly Emerging Therapies Targeting Viral-related Lymphomas. *Curr. Oncol. Rep.* **13**, 416–426 (2011).

182. Welters, M. J. P. *et al.* Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine. *Clin. Cancer Res.* **14**, 178–187 (2008).

183. Kenter, G. G. Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *N Engl J Med* **10** (2009).

184. Schraml, B. U. & Reis e Sousa, C. Defining dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 13–20 (2015).

185. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation:

functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* **33**, 1104–1116 (2014).

186. Roberts, E. W. *et al.* Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* **30**, 324–336 (2016).

187. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, eaah4573 (2017).

188. Somersan, S. *et al.* Primary Tumor Tissue Lysates Are Enriched in Heat Shock Proteins and Induce the Maturation of Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* **167**, 4844–4852 (2001).

189. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).

190. Wilkin, F. *et al.* The P2Y₁₁ Receptor Mediates the ATP-Induced Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* **166**, 7172–7177 (2001).

191. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).

192. Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86–89 (1998).

193. Mintern, J. D., Macri, C. & Villadangos, J. A. Modulation of antigen presentation by intracellular trafficking. *Curr. Opin. Immunol.* **34**, 16–21 (2015).

194. Trombetta, E. S. & Mellman, I. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).

195. Vigneron, N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).

196. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480–483 (2002).

197. bjorkman1987.pdf.

198. Brodsky, F. M. & Guagliardi, L. E. The Cell Biology of Antigen Processing and Presentation. 38.

199. Roche, P. A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 203–216 (2015).

200. Halloran, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **15** (2004).

201. Norcross, M. A. A SYNAPTIC BASIS FOR T-LYMPHOCYTE ACTIVATION. *Ann. Immunol.* **135D**, 113–134 (1984).

202. Paul, W. E. *et al.* Regulation of B-Lymphocyte Activation, Proliferation, and Differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **505**, 82–89 (1987).

203. Friedl, P., den Boer, A. Th. & Gunzer, M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 532–545 (2005).

204. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4⁺ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).

205. Geginat, J. *et al.* Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front. Immunol.* **5**, (2014).

206. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* **8**, 36 (2016).

207. Kim, H.-J. & Cantor, H. CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 91–98 (2014).

208. Szabo, S. J. Distinct Effects of T-bet in TH1 Lineage Commitment and IFN- γ Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science* **295**, 338–342 (2002).

209. Zheng, W. & Flavell, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and

- Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).
210. Schüler, T., Qin, Z., Ibe, S., Noben-Trauth, N. & Blankenstein, T. T Helper Cell Type 1-associated and Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Tumor Immunity Is Impaired in Interleukin 4-deficient Mice. *J. Exp. Med.* **189**, 803–810 (1999).
 211. Nishimura, T. *et al.* Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *J. Exp. Med.* **190**, 617–628 (1999).
 212. Corthay, A. *et al.* Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells. *Immunity* **22**, 371–383 (2005).
 213. Tepper, R. I., Pattengale, P. K. & Leder, P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* **57**, 503–512 (1989).
 214. Tepper, R., Coffman, R. & Leder, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* **257**, 548–551 (1992).
 215. Mattes, J. *et al.* Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 387–393 (2003).
 216. Ochi, A. *et al.* MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1671–1687 (2012).
 217. Tatsumi, T. *et al.* Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4+ T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB10401+ Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. *J. Exp. Med.* **196**, 619–628 (2002).
 218. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
 219. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999 (2012).
 220. Miyahara, Y. *et al.* Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15505–15510 (2008).
 221. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1149 (2009).
 222. Zou, W. & Restifo, N. P. TH17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 248–256 (2010).
 223. Numasaki, M. *et al.* IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis. *J. Immunol.* **175**, 6177–6189 (2005).
 224. Tartour, E. *et al.* Interleukin 17, a T-cell-derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice. *Cancer Res.* **59**, 3698–3704 (1999).
 225. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
 226. Martin-Orozco, N. *et al.* Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
 227. Muranski, P. *et al.* Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity* **35**, 972–985 (2011).
 228. Muranski, P. & Restifo, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402–2414 (2013).
 229. Hamai, A. *et al.* Human TH17 Immune Cells Specific for the Tumor Antigen MAGE-A3 Convert to IFN- γ -Secreting Cells as They Differentiate into Effector T Cells In Vivo. *Cancer Res.* **72**, 1059–1063 (2012).
 230. Xie, Y. *et al.* Naïve tumor-specific CD4+ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J. Exp. Med.* **207**, 651–667 (2010).
 231. Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M.-C. & Lapointe, R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **1**, 908–916 (2012).

232. Thelemann, C. *et al.* Interferon- γ induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PloS One* **9**, e86844 (2014).
233. Quezada, S. A. *et al.* Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637–650 (2010).
234. Takeuchi, A. *et al.* CRTAM determines the CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp. Med.* **213**, 123–138 (2016).
235. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4⁺ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
236. Brien, J. D., Uhrlaub, J. L. & Nikolich-Zugich, J. West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct anti-viral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8568–8575 (2008).
237. Hirschhorn-Cymerman, D. *et al.* Induction of tumoricidal function in CD4⁺ T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *J. Exp. Med.* **209**, 2113–2126 (2012).
238. Curran, M. A. *et al.* Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J. Exp. Med.* **210**, 743–755 (2013).
239. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D. & MacLennan, I. C. M. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 335–368 (2016).
240. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892 (2013).
241. Yoshitomi, H. *et al.* Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
242. Bindea, G. *et al.* Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
243. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
244. Preston, C. C. *et al.* The Ratios of CD8⁺ T Cells to CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ and FOXP3⁻ T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLoS ONE* **8**, (2013).
245. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–949 (2004).
246. Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M. & Swartz, M. A. Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science* **328**, 749–752 (2010).
247. Dardalhon, V. *et al.* Interleukin 4 inhibits TGF- β -induced-Foxp3⁺T cells and generates, in combination with TGF- β , Foxp3⁻ effector T cells that produce interleukins 9 and 10. *Nat. Immunol.* **9**, 1347–1355 (2008).
248. Li, H., Nourbakhsh, B., Cullimore, M., Zhang, G.-X. & Rostami, A. IL-9 is important for T cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2197–2206 (2011).
249. Soroosh, P. & Doherty, T. A. Th9 and allergic disease. *Immunology* **127**, 450–458 (2009).
250. Fischer, M. *et al.* Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **17**, 2513–2516 (2003).
251. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin 9. *Nat. Med.* **18**, 1248–1253 (2012).
252. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* **15**, 758–766 (2014).
253. Lanfranca, M. P., Lin, Y., Fang, J., Zou, W. & Frankel, T. Biological and Pathological

- Activities of Interleukin-22. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **94**, 523–534 (2016).
254. Jiang, R. *et al.* Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* **54**, 900–909 (2011).
255. Wen, Z. *et al.* High Expression of Interleukin-22 and Its Receptor Predicts Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 125–132 (2014).
256. Zhuang, Y. *et al.* Increased intratumoral IL-22-producing CD4⁺ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1965–1975 (2012).
257. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
258. Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 69–94 (2012).
259. Franciszkiewicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C. & Mami-Chouaib, F. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Shaping the Effector Phase of the Antitumor Immune Response. *Cancer Res.* **72**, 6325–6332 (2012).
260. Girard, J.-P., Moussion, C. & Förster, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 762–773 (2012).
261. Martinet, L. *et al.* High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions. *OncolImmunology* **1**, 829–839 (2012).
262. Martinet, L., Garrido, I. & Girard, J.-P. Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology* **1**, 789–790 (2012).
263. Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 952–961 (2003).
264. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* **173**, 1099–1109 (1991).
265. Peters, P. J. *et al.* Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1469–1475 (1989).
266. Pipkin, M. E. *et al.* Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs that Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
267. Grasso, C. S. *et al.* Conserved Interferon- γ Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell* **38**, 500–515.e3 (2020).
268. Montfort, A. *et al.* The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
269. Kennedy, R. & Celis, E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* **222**, 129–144 (2008).
270. Schattner, E. J. *et al.* CD4⁺ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood* **88**, 1375–1382 (1996).
271. Thomas, W. D. & Hersey, P. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells. *J. Immunol.* **161**, 2195–2200 (1998).
272. Keene, J.-A. & Forman, J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 768–782 (1982).
273. Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. A. P. & Heath, W. R. Induction of a CD8⁺ Cytotoxic T Lymphocyte Response by Cross-priming Requires Cognate CD4⁺ T Cell Help. *J. Exp. Med.* **186**, 65–70 (1997).
274. Laidlaw, B. J., Craft, J. E. & Kaech, S. M. The multifaceted role of CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 102–111 (2016).
275. Castellino, F. & Germain, R. N. COOPERATION BETWEEN CD4⁺ AND CD8⁺ T

- CELLS: When, Where, and How. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 519–540 (2006).
276. Eickhoff, S. *et al.* Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell* **162**, 1322–1337 (2015).
277. Hor, J. L. *et al.* Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* **43**, 554–565 (2015).
278. Brewitz, A. *et al.* CD8⁺ T cells orchestrate pDC – XCR1⁺ dendritic cell spatial and functional cooperativity to optimize priming. *Immunity* **46**, 205–219 (2017).
279. Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474–478 (1998).
280. Bevan, M. J. Helping the CD8⁺ T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
281. Bedoui, S., Heath, W. R. & Mueller, S. N. CD4⁺ T-cell help amplifies innate signals for primary CD8⁺ T-cell immunity. *Immunol. Rev.* **272**, 52–64 (2016).
282. Wiesel, M., Kratky, W. & Oxenius, A. Type I IFN Substitutes for T Cell Help during Viral Infections. *J. Immunol.* **186**, 754–763 (2011).
283. Schulz, O. *et al.* CD40 Triggering of Heterodimeric IL-12 p70 Production by Dendritic Cells In Vivo Requires a Microbial Priming Signal. *Immunity* **13**, 453–462 (2000).
284. Schluns, K. S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X. X. & Lefrançois, L. Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. *J. Immunol.* **168**, 4827–4831 (2002).
285. Bullock, T. N. J. & Yagita, H. Induction of CD70 on Dendritic Cells through CD40 or TLR Stimulation Contributes to the Development of CD8⁺ T Cell Responses in the Absence of CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* **174**, 710–717 (2005).
286. Peperzak, V., Veraar, E. A. M., Keller, A. M., Xiao, Y. & Borst, J. The Pim Kinase Pathway Contributes to Survival Signaling in Primed CD8⁺ T Cells upon CD27 Costimulation. *J. Immunol.* **185**, 6670–6678 (2010).
287. van de Ven, K. & Borst, J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy* **7**, 655–667 (2015).
288. Obar, J. J. *et al.* CD4⁺ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8⁺ T cells in primary and secondary responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 193–198 (2010).
289. Ahrends, T. *et al.* CD4⁺ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity* **47**, 848–861.e5 (2017).
290. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
291. Silva-Santos, B., Serre, K. & Norell, H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 683–691 (2015).
292. Bonneville, M., O’Brien, R. L. & Born, W. K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 467–478 (2010).
293. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21**, 938–945 (2015).
294. Jacques, J. Stimulation of ~ 6 T cells by phosphoantigens. 10.
295. Karunakaran, M. M. *et al.* Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity* **52**, 487–498.e6 (2020).
296. Tanaka, Y. *et al.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **375**, 155–158 (1995).
297. Girlanda, S. *et al.* MICA Expressed by Multiple Myeloma and Monoclonal

- Gammopathy of Undetermined Significance Plasma Cells Costimulates Pamidronate-Activated $\gamma\delta$ Lymphocytes. *Cancer Res.* **65**, 7502–7508 (2005).
298. Lança, T. *et al.* The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity. *Blood* **115**, 2407–2411 (2010).
299. Kong, Y. *et al.* The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR γ 9/ δ 2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR $\gamma\delta$ and NKG2D. *Blood* **114**, 310–317 (2009).
300. Wu, P. *et al.* $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity* **40**, 785–800 (2014).
301. Meraviglia, S. *et al.* Distinctive features of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
302. Wu, Y. *et al.* An innate-like V δ 1+ $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
303. Rei, M., Pennington, D. J. & Silva-Santos, B. The Emerging Protumor Role of $\gamma\delta$ T Lymphocytes: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* **75**, 798–802 (2015).
304. Sebestyen, Z., Prinz, I., Déchanet-Merville, J., Silva-Santos, B. & Kuball, J. Translating gammadelta ($\gamma\delta$) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 169–184 (2020).
305. Sallusto, F., Lenig, D. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *5* (1999).
306. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. C E N T R A L M E M O R Y A N D E F F E C T O R M E M O R Y T C E L L S U B S E T S : Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
307. Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **187**, 875–883 (1998).
308. Woodberry, T. *et al.* α E β 7 (CD103) Expression Identifies a Highly Active, Tonsil-Resident Effector-Memory CTL Population. *J. Immunol.* **175**, 4355–4362 (2005).
309. Zundler, S. *et al.* Author Correction: Hobit- and Blimp-1-driven CD4 + tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation. *Nat. Immunol.* **20**, 514–514 (2019).
310. Ariotti, S. *et al.* Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 19739–19744 (2012).
311. Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 509–513 (2013).
312. Mami-Chouaib, F. *et al.* Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J. Immunother. Cancer* **6**, 87 (2018).
313. Ray, S. J. *et al.* The Collagen Binding α 1 β 1 Integrin VLA-1 Regulates CD8 T Cell-Mediated Immune Protection against Heterologous Influenza Infection. *Immunity* **20**, 167–179 (2004).
314. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–1301 (2013).
315. Watanabe, R. *et al.* Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci. Transl. Med.* **7**, 279ra39-279ra39 (2015).
316. Casey, K. A. *et al.* Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *J. Immunol.* **188**, 4866–4875 (2012).
317. Skon, C. N. *et al.* Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 1285–1293 (2013).
318. Schenkel, J. M. *et al.* IL-15-Independent Maintenance of Tissue-Resident and Boosted Effector Memory CD8 T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 3920–3926 (2016).
319. Yu, C. I. *et al.* Human CD1c+ Dendritic Cells Drive the Differentiation of CD103+

- CD8+ Mucosal Effector T Cells via the Cytokine TGF- β . *Immunity* **38**, 818–830 (2013).
320. Mackay, L. K. *et al.* The developmental pathway for CD103 + CD8 + tissue-resident memory T cells of skin. *Nat. Immunol.* **14**, 1294–1301 (2013).
321. Enamorado, M. *et al.* Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8 + T cells. *Nat. Commun.* **8**, 16073 (2017).
322. Djenidi, F. *et al.* CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *J. Immunol.* **194**, 3475–3486 (2015).
323. Komdeur, F. L. *et al.* CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *OncoImmunology* **6**, e1338230 (2017).
324. Amsen, D., van Gisbergen, K. P. J. M., Hombrink, P. & van Lier, R. A. W. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.* **19**, 538–546 (2018).
325. Ganesan, A.-P. *et al.* Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat. Immunol.* **18**, 940–950 (2017).
326. Nizard, M. *et al.* Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat. Commun.* **8**, 15221 (2017).
327. Franciszkiewicz, K. *et al.* CD103 or LFA-1 Engagement at the Immune Synapse between Cytotoxic T Cells and Tumor Cells Promotes Maturation and Regulates T-cell Effector Functions. *Cancer Res.* **73**, 617–628 (2013).
328. Pickup, M., Novitskiy, S. & Moses, H. L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 788–799 (2013).
329. Boutet, M. *et al.* TGF β Signaling Intersects with CD103 Integrin Signaling to Promote T-Lymphocyte Accumulation and Antitumor Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **76**, 1757–1769 (2016).
330. Milner, J. J. *et al.* Erratum: Runx3 programs CD8 + T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature* **554**, 392–392 (2018).
331. Mami-Chouaib, F. & Tartour, E. Editorial: Tissue Resident Memory T Cells. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
332. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
333. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* **357**, 539–545 (2001).
334. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
335. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
336. Aguirre-Ghiso, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 834–846 (2007).
337. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
338. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–567 (2014).
339. Kowanetz, M. *et al.* Differential regulation of PD-L1 expression by immune and tumor cells in NSCLC and the response to treatment with atezolizumab (anti-PD-L1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E10119–E10126 (2018).
340. Fehrenbacher, L. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet* **387**, 1837–1846 (2016).

341. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
342. Joyce, J. A. & Fearon, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **348**, 74–80 (2015).
343. Salmon, H. *et al.* Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J. Clin. Invest.* **122**, 899–910 (2012).
344. Kim, J. M. & Chen, D. S. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann. Oncol.* **27**, 1492–1504 (2016).
345. Hegde, P. S., Karanikas, V. & Evers, S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1865–1874 (2016).
346. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203–213 (2003).
347. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).
348. Atkins, D. *et al.* MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* **109**, 265–273 (2004).
349. Bradley, S. D. *et al.* BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 602–609 (2015).
350. Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G. & Hacohen, N. Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity. *Cell* **160**, 48–61 (2015).
351. Chang, J. T., Wherry, E. J. & Goldrath, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **15**, 1104–1115 (2014).
352. Parkes, M., Cortes, A., van Heel, D. A. & Brown, M. A. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 661–673 (2013).
353. Apetoh, L. *et al.* The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* **220**, 47–59 (2007).
354. Garrett, W. S. Cancer and the microbiota. *Science* **348**, 80–86 (2015).
355. Sivan, A. *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–1089 (2015).
356. Mizukami, Y. *et al.* CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **122**, 2286–2293 (2008).
357. Ward, S. T. *et al.* The effects of CCR5 inhibition on regulatory T-cell recruitment to colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 319–328 (2015).
358. Redjimi, N. *et al.* CXCR3+ T Regulatory Cells Selectively Accumulate in Human Ovarian Carcinomas to Limit Type I Immunity. *Cancer Res.* **72**, 4351–4360 (2012).
359. Ren, L. *et al.* Hypoxia-induced CCL28 promotes recruitment of regulatory T cells and tumor growth in liver cancer. *Oncotarget* **7**, 75763–75773 (2016).
360. Facciabene, A. *et al.* Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T reg cells. *Nature* **475**, 226–230 (2011).
361. Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M. & Tokura, Y. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4+ T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* **103**, 449–457 (2001).
362. Chen, W. *et al.* Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**,

- 1875–1886 (2003).
363. Zarek, P. E. *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259 (2008).
364. Liu, V. C. *et al.* Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4+CD25– T Cells into CD4+CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- β . *J. Immunol.* **178**, 2883–2892 (2007).
365. Sharma, M. D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* **117**, 2570–2582 (2007).
366. Coffelt, S. B. *et al.* Angiopoietin 2 Stimulates TIE2-Expressing Monocytes To Suppress T Cell Activation and To Promote Regulatory T Cell Expansion. *J. Immunol.* **186**, 4183–4190 (2011).
367. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
368. Mourmouras, V. *et al.* Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. *Br. J. Dermatol.* **157**, 531–539 (2007).
369. Ahmadzadeh, M. & Rosenberg, S. A. IL-2 administration increases CD4+CD25hi Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* **107**, 2409–2414 (2006).
370. Jandus, C., Bioley, G., Speiser, D. E. & Romero, P. Selective accumulation of differentiated FOXP3+ CD4+ T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1795–1805 (2008).
371. Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 6301–6311 (2007).
372. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
373. Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. & Shevach, E. M. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *J. Immunol.* **172**, 6519–6523 (2004).
374. Facciabene, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Res.* **72**, 2162–2171 (2012).
375. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
376. Strauss, L. *et al.* A Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4345–4354 (2007).
377. Ren, X. *et al.* Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Cell Death Differ.* **14**, 2076–2084 (2007).
378. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783–1786 (2005).
379. Umansky, V., Blattner, C., Gebhardt, C. & Utikal, J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines* **4**, 36 (2016).
380. LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F. & Ferrara, N. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16813–16818 (2004).
381. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E. & Gabrilovich, D. I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* **37**, 208–220 (2016).

382. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
383. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **59**, 1593–1600 (2010).
384. Nagaraj, S. *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8 + T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* **13**, 828–835 (2007).
385. Pan, P.-Y. *et al.* Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cancer Res.* **70**, 99–108 (2010).
386. Weide, B. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells predict survival of patients with advanced melanoma: comparison with regulatory T cells and NY-ESO-1- or melan-A-specific T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1601–1609 (2014).
387. Coana, Y. P. de *et al.* Ipilimumab treatment decreases monocytic MDSCs and increases CD8 effector memory T cells in long-term survivors with advanced melanoma. *Oncotarget* **8**, 21539–21553 (2017).
388. Kerkar, S. P. *et al.* IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J. Clin. Invest.* **121**, 4746–4757 (2011).
389. Sica, A. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* **7** (2008).
390. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555 (2002).
391. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* **66**, 605–612 (2006).
392. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
393. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
394. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
395. Mantovani, Alberto, Sica, Antonio & Locati, M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* **23**, 344–346 (2005).
396. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096–1103 (1996).
397. Ohm, J. E. *et al.* VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* **101**, 4878–4886 (2003).
398. Voron, T. *et al.* VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J. Exp. Med.* **212**, 139–148 (2015).
399. Kim, J. *et al.* Loss of Fibroblast HIF-1 α Accelerates Tumorigenesis. *Cancer Res.* **72**, 3187–3195 (2012).
400. Palazon, A. *et al.* An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* **32**, 669–683.e5 (2017).
401. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2014).
402. Mullen, A. C. *et al.* Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- β Signaling. *Cell* **147**, 565–576 (2011).
403. Padua, D. & Massagué, J. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89–102 (2009).
404. Lu, S.-L. *et al.* Loss of transforming growth factor- β type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev.* **20**, 1331–1342 (2006).
405. Cheng, M.-L. *et al.* Clonal restriction of the expansion of antigen-specific CD8+ memory T cells by transforming growth factor- β . *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1033–1042 (2006).

406. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161 (1998).
407. Park, B. V. *et al.* TGF- β 1-mediated Smad3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer. *Cancer Discov.* **6**, 1366–1381 (2016).
408. Bright, J. J. & Sriram, S. TGF- β Inhibits IL-12-Induced Activation of Jak-STAT Pathway in T Lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 1772–1777 (1998).
409. Hotter, W. *et al.* Transforming growth factor- β inhibits IL-4 and IFN- γ production by stimulated human T cells. *Int. Immunol.* **6**, 469–475 (1994).
410. Chalmin, F. *et al.* Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity* **36**, 362–373 (2012).
411. Battle, E. & Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
412. Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clin. Med. Res.* **3**, 166–175 (2005).
413. Zhang, F. *et al.* TGF- β 2; induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget* **7**, 52294–52306 (2016).
414. Wu, G. & Morris, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336**, 1–17 (1998).
415. Hibbs, J. B., Taintor, R. R. & Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473–476 (1987).
416. Jenkinson, C. P., Grody, W. W. & Cederbaum, S. D. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **114**, 107–132 (1996).
417. Grzywa, T. M. *et al.* Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
418. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res.* **64**, 5839–5849 (2004).
419. Munder, M. *et al.* Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* **108**, 1627–1634 (2006).
420. O'Brien, T. G., Megosh, L. C., Gilliard, G. & Soler, A. P. Ornithine Decarboxylase Overexpression Is a Sufficient Condition for Tumor Promotion in Mouse Skin. *Cancer Res.* **57**, 2630–2637 (1997).
421. Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* **36**, 161–178 (2015).
422. Okamoto, A. *et al.* Indoleamine 2,3-Dioxygenase Serves as a Marker of Poor Prognosis in Gene Expression Profiles of Serous Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6030–6039 (2005).
423. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* **117**, 1147–1154 (2007).
424. Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Munn, D. H., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J. Exp. Med.* **210**, 1389–1402 (2013).
425. Spranger, S. *et al.* Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8⁺ T cells directly within the tumor microenvironment. *J. Immunother. Cancer* **2**, 3 (2014).
426. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P. & Haskó, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 842–857 (2013).
427. Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*

1783, 673–694 (2008).

428. Bours, M. J. L., Swennen, E. L. R., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N. & Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **112**, 358–404 (2006).
429. de Andrade Mello, P., Coutinho-Silva, R. & Savio, L. E. B. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor–Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
430. Milne, G. R. & Palmer, T. M. Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of the A2A Adenosine Receptor. *TheScientificWorldJOURNAL* vol. 11 320–339 <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2011/564203/> (2011).
431. Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C. & Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* **276**, 121–144 (2017).
432. Allard, B., Turcotte, M. & Stagg, J. CD73-Generated Adenosine: Orchestrating the Tumor-Stroma Interplay to Promote Cancer Growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* vol. 2012 e485156 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/485156/> (2012).
433. Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 759–770 (2008).
434. Ohta, A. *et al.* The development and immunosuppressive functions of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
435. Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C. & Borea, P. A. Adenosine receptors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 1400–1412 (2011).
436. Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L. & Diederich, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology* vol. 2010 e215158 <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/215158/> (2010).
437. Chan, A. T. Aspirin and the Risk of Colorectal Cancer in Relation to the Expression of COX-2. *N Engl J Med* **12** (2007).
438. Wang, D. & DuBois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 181–193 (2010).
439. Snijdewint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E. A. & Bos, J. D. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **10**.
440. Zeddou, M. *et al.* Prostaglandin E2 induces the expression of functional inhibitory CD94/NKG2A receptors in human CD8⁺ T lymphocytes by a cAMP-dependent protein kinase A type I pathway. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 714–724 (2005).
441. Baratelli, F. *et al.* Prostaglandin E2 Induces FOXP3 Gene Expression and T Regulatory Cell Function in Human CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* **175**, 1483–1490 (2005).
442. Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M. & Ostrand-Rosenberg, S. Prostaglandin E2 Promotes Tumor Progression by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **67**, 4507–4513 (2007).
443. Keith, R. L. *et al.* Prostaglandin E2 Receptor Subtype 2 (EP2) Null Mice are Protected Against Murine Lung Tumorigenesis. *ANTICANCER Res.* **5** (2006).
444. Khong, H. T. & Restifo, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* **3**, 999–1005 (2002).
445. Gabrilovich, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 941–952 (2004).
446. Conejo-Garcia, J. R. *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat. Med.* **10**, 950–958 (2004).

447. Almand, B. *et al.* Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1755–1766 (2000).
448. Curiel, T. J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell–mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* **9**, 562–567 (2003).
449. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
450. Muthuswamy, R. *et al.* NF- κ B Hyperactivation in Tumor Tissues Allows Tumor-Selective Reprogramming of the Chemokine Microenvironment to Enhance the Recruitment of Cytolytic T Effector Cells. *Cancer Res.* **72**, 3735–3743 (2012).
451. Pivarsci, A. *et al.* Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19055–19060 (2007).
452. Loos, T., Mortier, A. & Proost, P. Chapter 1 Isolation, Identification, and Production of Posttranslationally Modified Chemokines. in *Methods in Enzymology* vol. 461 3–29 (Academic Press, 2009).
453. Molon, B. *et al.* Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1949–1962 (2011).
454. Proost, P. *et al.* Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood* **110**, 37–44 (2007).
455. Griffioen, A. W., Damen, C. A., Blijham, G. H. & Groenewegen, G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood* **88**, 667–673 (1996).
456. Bouzin, C., Brouet, A., Vriese, J. D., DeWever, J. & Feron, O. Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on the Lymphocyte-Endothelium Interactions: Identification of Caveolin-1 and Nitric Oxide as Control Points of Endothelial Cell Anergy. *J. Immunol.* **178**, 1505–1511 (2007).
457. Bagnato, A. & Rosanò, L. The endothelin axis in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1443–1451 (2008).
458. Buckanovich, R. J. *et al.* Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med.* **14**, 28–36 (2008).
459. Rodig, N. *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3117–3126 (2003).
460. Mulligan, J. K. & Young, M. R. I. Tumors induce the formation of suppressor endothelial cells in vivo. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 267 (2009).
461. Alas, S. & Bonavida, B. Rituximab Inactivates Signal Transducer and Activation of Transcription 3 (STAT3) Activity in B-Non-Hodgkin's Lymphoma through Inhibition of the Interleukin 10 Autocrine/Paracrine Loop and Results in Down-Regulation of Bcl-2 and Sensitization to Cytotoxic Drugs. 9.
462. Karlhofer, F. M., Ribaldo, R. K. & Yokoyama, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49 + IL-2-activated natural killer cells. *Nature* **358**, 66–70 (1992).
463. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
464. Odorizzi, P. M. & Wherry, E. J. Inhibitory Receptors on Lymphocytes: Insights from Infections. *J. Immunol.* **188**, 2957–2965 (2012).
465. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8 + T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
466. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctla-4. *Science* **270**, 985–988 (1995).
467. Tivol, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.

Immunity **3**, 541–547 (1995).

468. Schneider, H., Prasad, K. V., Shoelson, S. E. & Rudd, C. E. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J. Exp. Med.* **181**, 351–355 (1995).

469. Hathcock, K. S. *et al.* Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* **262**, 905–907 (1993).

470. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).

471. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).

472. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).

473. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J. & Allison, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* **206**, 1717–1725 (2009).

474. Wing, K. *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* **322**, 271–275 (2008).

475. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–3895 (1992).

476. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–1034 (2000).

477. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537–1544 (2009).

478. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).

479. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).

480. Kim, J. *et al.* Constitutive and Inducible Expression of B7 Family of Ligands by Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**, 280–289 (2005).

481. Taube, J. M. *et al.* Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127ra37–127ra37 (2012).

482. Riley, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.* **229**, 114–125 (2009).

483. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).

484. Parry, R. V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9543–9553 (2005).

485. Bennett, F. *et al.* Program Death-1 Engagement Upon TCR Activation Has Distinct Effects on Costimulation and Cytokine-Driven Proliferation: Attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, But Not CD28, IL-7, and IL-15 Responses. *J. Immunol.* **170**, 711–718 (2003).

486. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).

487. Kamphorst, A. O. *et al.* Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1–targeted therapies is CD28-dependent. *Science* **355**, 1423–1427 (2017).

488. Fife, B. T. *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* **10**, 1185–1192 (2009).

489. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–3029 (2009).

490. Chauvin, J.-M. & Zarour, H. M. TIGIT in cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000957 (2020).
491. Chauvin, J.-M. *et al.* TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 2046–2058 (2015).
492. Johnston, R. J. *et al.* The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8⁺ T Cell Effector Function. *Cancer Cell* **26**, 923–937 (2014).
493. Liu, S. *et al.* Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ.* **20**, 456–464 (2013).
494. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 48–57 (2009).
495. Joller, N. *et al.* Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *J. Immunol.* **186**, 1338–1342 (2011).
496. Stanietsky, N. *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 17858–17863 (2009).
497. Joller, N. *et al.* Treg Cells Expressing the Coinhibitory Molecule TIGIT Selectively Inhibit Proinflammatory Th1 and Th17 Cell Responses. *Immunity* **40**, 569–581 (2014).
498. Gur, C. *et al.* Binding of the Fap2 Protein of *Fusobacterium nucleatum* to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack. *Immunity* **42**, 344–355 (2015).
499. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2015).
500. Zhang, Q. *et al.* Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **19**, 723–732 (2018).
501. Monney, L. *et al.* Th1-speci@c cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. **415**, 6 (2002).
502. Zhang, Y., Cai, P., Liang, T., Wang, L. & Hu, L. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 31705–31713 (2017).
503. Anderson, A. C. *et al.* T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur. J. Immunol.* **40**, 859–866 (2010).
504. Chihara, N. *et al.* Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells. *Nature* **558**, 454–459 (2018).
505. de Mingo Pulido, Á. *et al.* TIM-3 Regulates CD103⁺ Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Cell* **33**, 60–74.e6 (2018).
506. Gao, X. *et al.* TIM-3 Expression Characterizes Regulatory T Cells in Tumor Tissues and Is Associated with Lung Cancer Progression. *PLOS ONE* **7**, e30676 (2012).
507. Li, H. *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342–1351 (2012).
508. Acharya, N., Sabatos-Peyton, C. & Anderson, A. C. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000911 (2020).
509. Rangachari, M. *et al.* Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* **18**, 1394–1400 (2012).
510. Clayton, K. L. *et al.* T Cell Ig and Mucin Domain-Containing Protein 3 Is Recruited to the Immune Synapse, Disrupts Stable Synapse Formation, and Associates with Receptor Phosphatases. *J. Immunol.* **192**, 782–791 (2014).
511. Jiang, X. *et al.* Tim-3 promotes tumor-promoting M2 macrophage polarization by binding to STAT1 and suppressing the STAT1-miR-155 signaling axis. *OncoImmunology* **5**, e1211219 (2016).

512. Silva, I. P. da *et al.* Reversal of NK-Cell Exhaustion in Advanced Melanoma by Tim-3 Blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 410–422 (2014).
513. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–2194 (2010).
514. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2011).
515. Shayan, G. *et al.* Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *OncoImmunology* **6**, e1261779 (2017).
516. Workman, C. J., Dugger, K. J. & Vignali, D. A. A. Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3. *J. Immunol.* **169**, 5392–5395 (2002).
517. Triebel, F. *et al.* LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* **171**, 1393–1405 (1990).
518. Bruniquel, D., Borie, N., Hannier, S. & Triebel, F. Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics* **48**, 116–124 (1998).
519. Kao, C. *et al.* Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8 + T cell responses during chronic infection. *Nat. Immunol.* **12**, 663–671 (2011).
520. Maruhashi, T. *et al.* LAG-3 inhibits the activation of CD4 + T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat. Immunol.* **19**, 1415–1426 (2018).
521. Maruhashi, T., Sugiura, D., Okazaki, I. & Okazaki, T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J. Immunother. Cancer* **8**, e001014 (2020).
522. Turnis, M. E., Andrews, L. P. & Vignali, D. A. A. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1892–1905 (2015).
523. Wei, T. *et al.* Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 2190–2201 (2015).
524. Richter, K., Agnellini, P. & Oxenius, A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int. Immunol.* **22**, 13–23 (2010).
525. Matsuzaki, J. *et al.* Tumor-infiltrating NY-ESO-1–specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7875–7880 (2010).
526. Goding, S. R. *et al.* Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4+ T Cells during Recurrence of Melanoma. *J. Immunol.* **190**, 4899–4909 (2013).
527. Andrews, L. P., Yano, H. & Vignali, D. A. A. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups. *Nat. Immunol.* **20**, 1425–1434 (2019).
528. Jackson, S. W. *et al.* Disordered Purinergic Signaling Inhibits Pathological Angiogenesis in Cd39/Entpd1-Null Mice. *Am. J. Pathol.* **171**, 1395–1404 (2007).
529. Künzli, B. M. *et al.* Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. *Purinergic Signal.* **7**, 231–241 (2011).
530. Sun, X. *et al.* Disordered purinergic signaling and abnormal cellular metabolism are associated with development of liver cancer in Cd39/Entpd1 null mice. *Hepatology. Baltim. Md* **57**, 205–216 (2013).
531. Allard, D., Allard, B. & Stagg, J. On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000186 (2020).
532. Gourdin, N. *et al.* Autocrine Adenosine Regulates Tumor Polyfunctional CD73+CD4+

- Effector T Cells Devoid of Immune Checkpoints. *Cancer Res.* **78**, 3604–3618 (2018).
533. Dwyer, K. M. *et al.* Expression of CD39 by Human Peripheral Blood CD4+CD25+ T Cells Denotes a Regulatory Memory Phenotype. *Am. J. Transplant.* **10**, 2410–2420 (2010).
534. Fang, F. *et al.* Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep.* **14**, 1218–1231 (2016).
535. Gupta, P. K. *et al.* CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog.* **11**, (2015).
536. Simoni, Y. *et al.* Bystander CD8 + T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* **557**, 575–579 (2018).
537. Duhen, T. *et al.* Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat. Commun.* **9**, 2724 (2018).
538. Bai, A. *et al.* NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8 + T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nat. Commun.* **6**, 8819 (2015).
539. Wang, L. *et al.* CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2371–2382 (2011).
540. Perrot, I. *et al.* Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep.* **27**, 2411–2425.e9 (2019).
541. Allard, B., Pommey, S., Smyth, M. J. & Stagg, J. Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 mAbs. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5626–5635 (2013).
542. Li, X.-Y. *et al.* Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. *Cancer Discov.* **9**, 1754–1773 (2019).
543. Moesta, A. K., Li, X.-Y. & Smyth, M. J. Targeting CD39 in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 739–755 (2020).
544. Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H. & Zinkernagel, R. M. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* **362**, 758–761 (1993).
545. Wherry, E. J. *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
546. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 2350–2360 (2011).
547. Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* **33**, 547–562 (2018).
548. Matloubian, M., Concepcion, R. J. & Ahmed, R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* **68**, 8056–8063 (1994).
549. Fourcade, J. *et al.* CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* **72**, 887–896 (2012).
550. Fuertes Marraco, S. A., Neubert, N. J., Verdeil, G. & Speiser, D. E. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
551. Odorizzi, P. M., Pauken, K. E., Paley, M. A., Sharpe, A. & Wherry, E. J. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **212**, 1125–1137 (2015).
552. Speiser, D. E., Ho, P.-C. & Verdeil, G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 599–611 (2016).
553. Philip, M. *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452–456 (2017).
554. Quigley, M. *et al.* Integrative genomic analysis of HIV-specific CD8+ T cells reveals

- that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat. Med.* **16**, 1147–1151 (2010).
555. Yao, C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8⁺ T cell persistence in chronic infection. *Nat. Immunol.* **20**, 890–901 (2019).
556. Man, K. *et al.* Transcription Factor IRF4 Promotes CD8⁺ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **47**, 1129–1141.e5 (2017).
557. Chen, J. *et al.* NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* **567**, 530–534 (2019).
558. Martinez, G. J. *et al.* The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity* **42**, 265–278 (2015).
559. Khan, O. *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature* **571**, 211–218 (2019).
560. Alfei, F. *et al.* TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature* **571**, 265–269 (2019).
561. Seo, H. *et al.* TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 12410–12415 (2019).
562. Scott, A. C. *et al.* TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270–274 (2019).
563. Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z. & Zou, W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 214–221 (2013).
564. Doering, T. A. *et al.* Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8⁺ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity* **37**, 1130–1144 (2012).
565. Crawford, A. *et al.* Molecular and Transcriptional Basis of CD4⁺ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity* **40**, 289–302 (2014).
566. Paley, M. A. *et al.* Progenitor and Terminal Subsets of CD8⁺ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* **338**, 1220–1225 (2012).
567. Utzschneider, D. T. *et al.* T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8⁺ T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* **45**, 415–427 (2016).
568. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat. Immunol.* **20**, 326–336 (2019).
569. Im, S. J. *et al.* Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
570. Brooks, D. G., McGavern, D. B. & Oldstone, M. B. A. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* **116**, 1675–1685 (2006).
571. Brooks, D. G., Teyton, L., Oldstone, M. B. A. & McGavern, D. B. Intrinsic Functional Dysregulation of CD4 T Cells Occurs Rapidly following Persistent Viral Infection. *J. Virol.* **79**, 10514–10527 (2005).
572. Fahey, L. M. *et al.* Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* **208**, 987–999 (2011).
573. Li, H. *et al.* Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell* **176**, 775–789.e18 (2019).
574. Bengsch, B. *et al.* Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* **48**, 1029–1045.e5 (2018).
575. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
576. Kurtulus, S. *et al.* Checkpoint Blockade Immunotherapy Induces Dynamic Changes in PD-1–CD8⁺ Tumor-Infiltrating T Cells. *Immunity* **50**, 181–194.e6 (2019).

577. Sade-Feldman, M. *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* **175**, 998–1013.e20 (2018).
578. Siddiqui, I. *et al.* Intratumoral Tcf1+PD-1+CD8+ T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* **50**, 195–211.e10 (2019).
579. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–1647 (1991).
580. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
581. Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 317–327 (2010).
582. Cheson, B. D. & Leonard, J. P. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 613–626 (2008).
583. McLaughlin, P. *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2825–2833 (1998).
584. Du, F. H., Mills, E. A. & Mao-Draayer, Y. Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Autoimmun. Highlights* **8**, 1–12 (2017).
585. DiLillo, D. J. *et al.* Maintenance of Long-Lived Plasma Cells and Serological Memory Despite Mature and Memory B Cell Depletion during CD20 Immunotherapy in Mice. *J. Immunol.* **180**, 361–371 (2008).
586. Engel, P., Gómez-Puerta, J. A., Ramos-Casals, M., Lozano, F. & Bosch, X. Therapeutic Targeting of B Cells for Rheumatic Autoimmune Diseases. *Pharmacol. Rev.* **63**, 127–156 (2011).
587. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW. *EMBO J.* **19**, 3159–3167 (2000).
588. Parakh, S. *et al.* Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **59**, 1–21 (2017).
589. Woods Ignatoski, K. M., Grewal, N. K., Markwart, S., Livant, D. L. & Ethier, S. P. p38MAPK Induces Cell Surface $\alpha 4$ Integrin Downregulation to Facilitate erbB-2-Mediated Invasion. *Neoplasia N. Y. N* **5**, 128–134 (2003).
590. Benz, C. C. *et al.* Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res. Treat.* **24**, 85–95 (1992).
591. Cobleigh, M. A. *et al.* Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2639–2639 (1999).
592. Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. **8**.
593. Baselga, J. *et al.* Relationship between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3755–3763 (2016).
594. Stagg, J. *et al.* Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 7142–7147 (2011).
595. Mondello, P., Cuzzocrea, S., Navarra, M. & Mian, M. 90 Y-ibritumomab tiuxetan: a nearly forgotten opportunity. *Oncotarget* **7**, 7597–7609 (2015).
596. Dahlén, E., Veitonmäki, N. & Norlén, P. Bispecific antibodies in cancer immunotherapy: *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* (2018) doi:10.1177/2515135518763280.
597. Trivedi, A. *et al.* Clinical Pharmacology and Translational Aspects of Bispecific

- Antibodies. *Clin. Transl. Sci.* **10**, 147–162 (2017).
598. Rosenberg, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* **192**, 5451–5458 (2014).
599. Lichty, B. D., Breitbach, C. J., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 559–567 (2014).
600. Liu, B. L. *et al.* ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* **10**, 292–303 (2003).
601. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III–IV melanoma. *J. Immunother. Cancer* **7**, 145 (2019).
602. Andtbacka, R. H. I. *et al.* Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2780–2788 (2015).
603. Zamarin, D. *et al.* Localized Oncolytic Virotherapy Overcomes Systemic Tumor Resistance to Immune Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **6**, 226ra32–226ra32 (2014).
604. Evgin, L. *et al.* Oncolytic virus-derived type I interferon restricts CAR T cell therapy. *Nat. Commun.* **11**, 3187 (2020).
605. Topalian, S. L., Weiner, G. J. & Pardoll, D. M. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4828–4836 (2011).
606. Hu, Z., Ott, P. A. & Wu, C. J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 168–182 (2018).
607. Soiffer, R. *et al.* Vaccination With Irradiated, Autologous Melanoma Cells Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Adenoviral-Mediated Gene Transfer Augments Antitumor Immunity in Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3343–3350 (2003).
608. Vaishampayan, U., Abrams, J., Darrah, D., Jones, V. & Mitchell, M. S. Active Immunotherapy of Metastatic Melanoma with Allogeneic Melanoma Lysates and Interferon α . *Clin. Cancer Res.* **8**, 3696–3701 (2002).
609. Dranoff, G. *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 3539–3543 (1993).
610. Geary, S. M., Lemke, C. D., Lubaroff, D. M. & Salem, A. K. Human prostate cancer vaccines – proposed mechanisms of action and future combinatorial treatment strategies. *Nat. Rev. Urol.* **10**, 149–160 (2013).
611. Le, D. T. *et al.* Safety and Survival With GVAX Pancreas Prime and Listeria Monocytogenes–Expressing Mesothelin (CRS-207) Boost Vaccines for Metastatic Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **12**.
612. Burkhardt, U. E. *et al.* Autologous CLL cell vaccination early after transplant induces leukemia-specific T cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 3756–3765 (2013).
613. Phan, V. *et al.* A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat. Med.* **9**, 1215–1219 (2003).
614. Rosenblatt, J. *et al.* Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci. Transl. Med.* **8**, 368ra171–368ra171 (2016).
615. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
616. Pyzer, A. R., Avigan, D. E. & Rosenblatt, J. Clinical trials of dendritic cell-based cancer vaccines in hematologic malignancies. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 3125–3131 (2015).
617. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev.*

Cancer **12**, 265–277 (2012).

618. Kantoff, P. W. *et al.* Overall Survival Analysis of a Phase II Randomized Controlled Trial of a Poxviral-Based PSA-Targeted Immunotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1099–1105 (2010).

619. Odunsi, K. *et al.* Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5797–5802 (2012).

620. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C. & Hung, C.-F. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 3153–3164 (2015).

621. Heil, F. *et al.* Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).

622. Rittig, S. M. *et al.* Intradermal Vaccinations With RNA Coding for TAA Generate CD8+ and CD4+ Immune Responses and Induce Clinical Benefit in Vaccinated Patients. *Mol. Ther.* **19**, 990–999 (2011).

623. Sahin, U. *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222–226 (2017).

624. Schwartzenuber, D. J. *et al.* gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2119–2127 (2011).

625. Melief, C. J. M. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *C N Ce R* **10** (2008).

626. Walter, S. *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* **18**, 1254–1261 (2012).

627. Sabbatini, P. *et al.* Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 6497–6508 (2012).

628. Giannakis, M. *et al.* Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* **15**, 857–865 (2016).

629. Rizvi, N. A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124–128 (2015).

630. Sahin, U. & Türeci, Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science* **359**, 1355–1360 (2018).

631. Carreno, B. M. *et al.* A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science* **348**, 803–808 (2015).

632. Ott, P. A. *et al.* An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* **547**, 217–221 (2017).

633. Türeci, Ö. *et al.* Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1885–1896 (2016).

634. Massarelli, E. *et al.* Combining Immune Checkpoint Blockade and Tumor-Specific Vaccine for Patients With Incurable Human Papillomavirus 16-Related Cancer. *JAMA Oncol.* **5**, 67–73 (2019).

635. Fefer, A. Immunotherapy and Chemotherapy of Moloney Sarcoma Virus-induced Tumors in Mice. *Cancer Res.* **29**, 2177–2183 (1969).

636. Greenberg, P. D., Cheever, M. A. & Fefer, A. Pillars Article: Eradication of Disseminated Murine Leukemia by Chemoimmunotherapy with Cyclophosphamide and Adoptively Transferred Immune Syngeneic Lyt-1+2- Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **154**: 952–963. *J. Immunol.* **190**, 1899–1910 (2013).

637. Dudley, M. E. *et al.* Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* **298**, 850–854 (2002).

638. Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients

- with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 233–240 (2009).
639. Rosenberg, S. A. *et al.* Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 4550–4557 (2011).
640. Stevanović, S. *et al.* Complete Regression of Metastatic Cervical Cancer After Treatment With Human Papillomavirus–Targeted Tumor-Infiltrating T Cells. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1543–1550 (2015).
641. Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 269–281 (2012).
642. Morgan, R. A. *et al.* Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
643. Stadtmauer, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* **367**, (2020).
644. Zhao, L. & Cao, Y. J. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
645. Porter, D. L. & Bagg, A. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **9** (2011).
646. Kochenderfer, J. N. *et al.* Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J. Clin. Oncol.* **11**.
647. Soria, J.-C. *et al.* Osimertinib in Untreated *EGFR* -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 113–125 (2018).
648. Ruella, M. & Kenderian, S. S. Next-Generation Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Going off the Shelf. *BioDrugs* **31**, 473–481 (2017).
649. Neelapu, S. S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2531–2544 (2017).
650. Benjamin, H. & Yiping, Y. New developments in immunotherapy for lymphoma. *Cancer Biol. Med.* **15**, 189 (2018).
651. Vairy, S., Garcia, J. L., Teira, P. & Bittencourt, H. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Drug Des.* **14**.
652. Rafiq, S. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Clin. Oncol.* **21**.
653. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
654. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12293–12297 (2002).
655. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
656. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–2526 (2011).
657. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I Study of Single-Agent Anti–Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
658. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
659. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2455–2465 (2012).
660. Robert, C. *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2521–2532 (2015).

661. Robert, C. *et al.* Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **372**, 320–330 (2015).
662. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
663. Forde, P. M. *et al.* Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1976–1986 (2018).
664. Zou, W., Wolchok, J. D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* **8**, 328rv4–328rv4 (2016).
665. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* **8**, 1069–1086 (2018).
666. Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R. & Chandra, A. B. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers* **12**, 738 (2020).
667. Migden, M. R. *et al.* PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **379**, 341–351 (2018).
668. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
669. Ramagopal, U. A. *et al.* Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E4223–E4232 (2017).
670. Selby, M. J. *et al.* Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 32–42 (2013).
671. Romano, E. *et al.* Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 6140–6145 (2015).
672. Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. & Ivars, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* **118**, 240–249 (2006).
673. Robert, L. *et al.* CTLA4 Blockade Broadens the Peripheral T-Cell Receptor Repertoire. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2424–2432 (2014).
674. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101 (2002).
675. Fan, X., Quezada, S. A., Sepulveda, M. A., Sharma, P. & Allison, J. P. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J. Exp. Med.* **211**, 715 (2014).
676. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120–1133.e17 (2017).
677. Fehlings, M. *et al.* Checkpoint blockade immunotherapy reshapes the high-dimensional phenotypic heterogeneity of murine intratumoural neoantigen-specific CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.* **8**, 562 (2017).
678. Velu, V. *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206–210 (2009).
679. Spitzer, M. H. *et al.* Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 487–502.e15 (2017).
680. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8⁺ T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
681. Ott, P. A., Hodi, F. S. & Robert, C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New

- Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5300–5309 (2013).
682. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
683. Gato-Cañas, M. *et al.* PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* **20**, 1818–1829 (2017).
684. Dahan, R. *et al.* FcγRs Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis. **12**.
685. Postow, M. A., Callahan, M. K. & Wolchok, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1974–1982 (2015).
686. Wolchok, J. D. *et al.* Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1345–1356 (2017).
687. Axelrod, M. L., Johnson, D. B. & Balko, J. M. Emerging biomarkers for cancer immunotherapy in melanoma. *Semin. Cancer Biol.* **52**, 207–215 (2018).
688. Ribas, A. *et al.* Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* **315**, 1600 (2016).
689. Rosenberg, J. E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* **387**, 1909–1920 (2016).
690. Postow, M. A., Sidlow, R. & Hellmann, M. D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N. Engl. J. Med.* **378**, 158–168 (2018).
691. Restifo, N. P., Smyth, M. J. & Snyder, A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 121–126 (2016).
692. Gide, T. N., Wilmott, J. S., Scolyer, R. A. & Long, G. V. Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **24**, 1260–1270 (2018).
693. Jiang, L. *et al.* PD-L1 expression and its relationship with oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget* **8**, 26845–26857 (2017).
694. Peng, W. *et al.* Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov.* **6**, 202–216 (2016).
695. Hugo, W. *et al.* Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35–44 (2016).
696. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, 97–103 (2018).
697. Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 539–573 (2016).
698. Huang, R.-Y., Francois, A., McGray, A. R., Miliotto, A. & Odunsi, K. Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology* **6**, (2016).
699. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* **7**, 10501 (2016).
700. Bertrand, F. *et al.* TNFα blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat. Commun.* **8**, 2256 (2017).
701. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **375**, 819–829 (2016).
702. Shin, D. S. *et al.* Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov.* **7**, 188–201 (2017).
703. Lee, J.-M. *et al.* Safety and Clinical Activity of the Programmed Death-Ligand 1 Inhibitor Durvalumab in Combination With Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib or Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-3 Inhibitor Cediranib in

- Women's Cancers: A Dose-Escalation, Phase I Study. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2193–2202 (2017).
704. Hamanishi, J. *et al.* Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 4015–4022 (2015).
705. Varga, A. *et al.* Pembrolizumab in patients with programmed death ligand 1-positive advanced ovarian cancer: Analysis of KEYNOTE-028. *Gynecol. Oncol.* **152**, 243–250 (2019).
706. Matulonis, U. A. *et al.* Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann. Oncol.* **30**, 1080–1087 (2019).
707. Mezache, L., Paniccia, B., Nyinawabera, A. & Nuovo, G. J. Enhanced expression of PD L1 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancers. *Mod. Pathol.* **28**, 1594–1602 (2015).
708. Chung, H. C. *et al.* Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1470–1478 (2019).
709. Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1856–1867 (2016).
710. Seiwert, T. Y. *et al.* Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **17**, 956–965 (2016).
711. Burtness, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* **394**, 1915–1928 (2019).
712. Chow, L. Q. M. *et al.* Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3838–3845 (2016).
713. Zandberg, D. P. *et al.* Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Results from a single-arm, phase II study in patients with $\geq 25\%$ tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **107**, 142–152 (2019).
714. Cohen, E. E. W. *et al.* The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J. Immunother. Cancer* **7**, 184 (2019).
715. Tang, J. *et al.* The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 854–855 (2018).
716. Heinhuis, K. M. *et al.* Enhancing antitumor response by combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in solid tumors. *Ann. Oncol.* **30**, 219–235 (2019).
717. Fukumura, D., Kloepper, J., Amoozgar, Z., Duda, D. G. & Jain, R. K. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 325–340 (2018).
718. Twyman-Saint Victor, C. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **520**, 373–377 (2015).
719. Postow, M. A. *et al.* Immunologic Correlates of the Abscopal Effect in a Patient with Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 925–931 (2012).
720. Burnette, B. *et al.* The Efficacy of Radiotherapy Relies Upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Res.* **71**, 2488–2496 (2011).
721. Vanpouille-Box, C. *et al.* DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017).
722. Formenti, S. C. *et al.* Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4

blockade. *Nat. Med.* **24**, 1845–1851 (2018).

723. Formenti, S. C. & Demaria, S. Radiation Therapy to Convert the Tumor Into an In Situ Vaccine. *Int. J. Radiat. Oncol.* **84**, 879–880 (2012).

724. Lhuillier, C., Rudqvist, N.-P., Elemento, O., Formenti, S. C. & Demaria, S. Radiation therapy and anti-tumor immunity: exposing immunogenic mutations to the immune system. *Genome Med.* **11**, (2019).

725. Woods, D. M. *et al.* HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1375–1385 (2015).

726. Mullinax, J. E. *et al.* Combination of Ipilimumab and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Front. Oncol.* **8**, 44 (2018).

727. Sahin, U. *et al.* An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* **585**, 107–112 (2020).

728. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* **118**, 9–16 (2018).

729. De Henau, O. *et al.* Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells. *Nature* **539**, 443–447 (2016).

730. Iannone, R., Miele, L., Maiolino, P., Pinto, A. & Morello, S. Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 172–181 (2014).

731. Alspach, E. *et al.* MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. *Nature* **574**, 696–701 (2019).

732. Garris, C. S. *et al.* Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity* **49**, 1148–1161.e7 (2018).

733. Tirosh, I. *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **352**, 189–196 (2016).

734. Schietinger, A. *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* **45**, 389–401 (2016).

735. van der Leun, A. M., Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. CD8 $^{+}$ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 218–232 (2020).

736. Wagner, J. *et al.* A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell* **177**, 1330–1345.e18 (2019).

737. van der Leun, A. M., Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. CD8 $^{+}$ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 218–232 (2020).

738. Clarke, J. *et al.* Single-cell transcriptomic analysis of tissue-resident memory T cells in human lung cancer. *J. Exp. Med.* **216**, 2128–2149 (2019).

739. Scheper, W. *et al.* Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat. Med.* **25**, 89–94 (2019).

740. Thommen, D. S. *et al.* A transcriptionally and functionally distinct PD-1 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat. Med.* **24**, 994–1004 (2018).

741. Kortekaas, K. E. *et al.* CD39 Identifies the CD4 $^{+}$ Tumor-Specific T-cell Population in Human Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 1311–1321 (2020).

742. Jiménez-Sánchez, A. *et al.* Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient. *Cell* **170**, 927–938.e20 (2017).

743. Savas, P. *et al.* Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat. Med.* **24**, 986–993 (2018).

744. Franciszkiewicz, K. *et al.* Intratumoral Induction of CD103 Triggers Tumor-Specific CTL Function and CCR5-Dependent T-Cell Retention. *Cancer Res.* **69**, 6249–6255 (2009).
745. Pallett, L. J. *et al.* IL-2high tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J. Exp. Med.* **214**, 1567–1580 (2017).
746. Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J. E. & Cyster, J. G. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *7*.
747. Hojo, S. *et al.* High-Level Expression of Chemokine CXCL16 by Tumor Cells Correlates with a Good Prognosis and Increased Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **67**, 4725–4731 (2007).
748. Kuwahara, M. *et al.* The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses T H 2 differentiation. *Nat. Immunol.* **13**, 778–786 (2012).
749. Gu-Trantien, C. *et al.* CXCL13-producing T_{FH} cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight* **2**, (2017).
750. Workel, H. H. *et al.* A Transcriptionally Distinct CXCL13+CD103+CD8+ T-cell Population Is Associated with B-cell Recruitment and Neoantigen Load in Human Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 784–796 (2019).
751. Ayyoub, M., Pignon, P., Classe, J.-M., Odunsi, K. & Valmori, D. CD4+ T Effectors Specific for the Tumor Antigen NY-ESO-1 Are Highly Enriched at Ovarian Cancer Sites and Coexist with, but Are Distinct from, Tumor-Associated Treg. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 303–308 (2013).
752. Ahrends, T. & Borst, J. The opposing roles of CD4+ T cells in anti-tumour immunity. *Immunology* **154**, 582–592 (2018).
753. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
754. Qin, L. *et al.* Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
755. Ahlmanner, F. *et al.* CD39 + regulatory T cells accumulate in colon adenocarcinomas and display markers of increased suppressive function. *Oncotarget* **9**, 36993–37007 (2018).
756. Canale, F. P. *et al.* CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res.* **78**, 115–128 (2018).
757. Noble, A., Mehta, H., Lovell, A., Papaioannou, E. & Fairbanks, L. IL-12 and IL-4 activate a CD39-dependent intrinsic peripheral tolerance mechanism in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1438–1448 (2016).
758. Adamiak, M. *et al.* The Inhibition of CD39 and CD73 Cell Surface Ectonucleotidases by Small Molecular Inhibitors Enhances the Mobilization of Bone Marrow Residing Stem Cells by Decreasing the Extracellular Level of Adenosine. *Stem Cell Rev. Rep.* **15**, 892–899 (2019).
759. Duraiswamy, J. *et al.* Phenotype, Function, and Gene Expression Profiles of Programmed Death-1hi CD8 T Cells in Healthy Human Adults. *J. Immunol.* **186**, 4200–4212 (2011).
760. LaFleur, M. W. *et al.* PTPN2 regulates the generation of exhausted CD8 + T cell subpopulations and restrains tumor immunity. *Nat. Immunol.* **20**, 1335–1347 (2019).
761. Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160–1165 (2016).
762. Yost, K. E. *et al.* Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat. Med.* **25**, 1251–1259 (2019).

Contribution of tumor antigen-specific T cell responses to the clinical efficacy of immunotherapy by PD-1/PD-L1 blockade

Exhausted tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are characterized by immune checkpoint (IC) expression, for instance PD-1. One of the major immunotherapy approaches, based on IC inhibition, has proved efficient in the control of tumor progression in many cancers. Despite this progress, only a proportion of patients experience clinical benefit. To improve responses to IC inhibitors, understanding mechanisms involved in TIL exhaustion and investigating which T cells are able to respond to immunotherapy are required. We investigated both CD8 and CD4 T-cell exhaustion and its relation to tumor antigen (Ag) specificity and to responsiveness to IC inhibition in cancer patients.

We demonstrated that CD8 T-cell exhaustion at the tumor site was only attained by tumor Ag-specific cells that were characterized by the sequential acquisition of ICs and by CD28 loss. Their circulating counterparts expressed less ICs and at lower levels and were CD28⁺. Specific CD8 TILs were dysfunctional, nonetheless, they maintained high cytotoxic potential and expressed tissue residency markers. We showed that PD-1 inhibition has a dual effect on specific CD8 T cells. It rescued their effector functions at the tumor site and enhanced their proliferation in the periphery. Importantly, the quantity of exhausted and specific TILs was predictive of response to therapy and of survival in patients treated with PD-1-targeting immunotherapy. Assessment of CD4 TIL exhaustion underscored similarities with the CD8 exhaustion program, in particular their specificity for tumor Ag and sequential acquisition of ICs although ICs characterizing terminally exhausted CD4 TILs were different than those found in CD8 TILs. Importantly, PD-1 blockade on CD4 TILs restored their helper functions, leading to dendritic cell maturation and, consequently, increased tumor-specific CD8 T-cell proliferation.

Our data imply that under anti-PD-1/PD-L1, effector functions of terminally exhausted CD8 TILs is rescued and the tumor site is replenished by memory CD8 T cells which proliferate following direct blockade of PD-1 and through reinvigoration of the helper activity of tumor Ag-specific CD4 T cells. Our results position tumor Ag-specific T cells as major players of responsiveness to PD-1-blocking immunotherapy and identify predictive biomarkers of response to immunotherapy.

Key words : Anti-cancer immunotherapy, immune checkpoint blockade, PD-1, PD-L1, tumor antigens, tumor-infiltrating lymphocytes, T cell exhaustion.

AUTEUR : Camille-Charlotte Balança

TITRE : Contribution des réponses immunitaires adaptatives spécifiques des antigènes tumoraux à l'efficacité clinique de l'immunothérapie par inhibition de l'axe PD-1/PD-L1.

DIRECTRICE DE THÈSE : Pr. Maha Ayyoub

SOUTENANCE : 18 février 2021, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole.

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) épuisés, sont caractérisés par l'expression de points de contrôle de l'immunité (PCI), par exemple PD-1. Une des approches majeures en immunothérapie, basée sur l'inhibition des PCI, s'est avérée efficace dans le contrôle de la progression tumorale dans plusieurs cancers. Malgré cette avancée, seule une proportion des patients en retire un bénéfice clinique. Afin d'améliorer les réponses à l'inhibition des PCI, il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans l'épuisement des TIL et d'élucider quels lymphocytes T (LT) sont capables de répondre à cette immunothérapie.

Au site tumoral, nous mettons en évidence que seuls les LT CD8 spécifiques des antigènes (Ag) tumoraux expriment quatre PCI ainsi que d'autres marqueurs d'épuisement et perdent la molécule de co-stimulation CD28, contrairement au LT CD8 spécifiques circulants. Les TIL CD8 spécifiques sont dysfonctionnels, néanmoins, ils possèdent un potentiel cytotoxique élevé et expriment des marqueurs de résidence. Nous montrons que l'inhibition de PD-1 a une double action sur les LT CD8 spécifiques. Elle rétablit leurs fonctions dans la tumeur et augmente leur prolifération dans la périphérie. De manière importante, l'infiltration des tumeurs par ces TIL spécifiques et épuisés est prédictive de la réponse à la thérapie et de la survie des patients traités par immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1. Les LT CD4 auxiliaires sont essentiels pour l'amorçage de la réponse T CD8. En revanche, leur rôle effecteur dans la tumeur a été moins étudié. Ici, nous montrons que les LT CD4 spécifiques des Ag tumoraux, également épuisés au site tumoral, peuvent être identifiés par des marqueurs qui leur sont propres. Des similarités dans le programme d'épuisement des LT CD4 et CD8 ont été retrouvées. Le blocage de PD-1 sur les TIL CD4 rétablit leur activation, ce qui va permettre la maturation des cellules dendritiques et, par conséquent, l'augmentation de la prolifération des TIL CD8 spécifiques de la tumeur.

Nos résultats révèlent que les TIL CD4 et CD8 spécifiques des Ag tumoraux épuisés peuvent être identifiés chez les patients par des marqueurs caractéristiques et qu'ils répondent à l'inhibition du PD-1 en rétablissant les fonctions des LT CD8 de manière directe et indirecte. Ces données identifient des biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie et positionnent les LT spécifiques des Ag tumoraux comme des acteurs de la réponse clinique à l'immunothérapie bloquant le PD-1.

Mots clefs : Immunothérapie anti-cancer, inhibition des points de contrôle immunitaire, PD-1, PD-L1, antigènes tumoraux, lymphocytes infiltrant la tumeur, épuisement des lymphocytes T.

Équipe 1 – Tumor immunity and immunotherapy (T2i)
Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse
2, avenue Hubert Curien
31037 Toulouse